

**EINE MULTIFUNKTIONELLE
BEGLEITKOMPONENTE
VON FIBRINOGEN**

Franz Jilek

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549006_0009

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

AUS DEM MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, MARTINSRIED
ABTEILUNG BINDEGEWEBSFORSCHUNG
PROF. DR. KLAUS KÜHN

EINE MULTIFUNKTIONELLE BEGLEITKOMPONENTE
VON FIBRINOGEN



INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DES FACHBEREICHES CHEMIE-
PHARMAZIE DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON

FRANZ JILEK

AUS

MÜNCHEN

1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Hörmann
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Guido Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 4.4.1978

Meinen Eltern und
meiner Frau

ABKÜRZUNGEN

AE-	Aminoäthyl-
AGF	Anti-Gelatine-Faktor
Alb	Humanes Albumin
BrCN	Bromcyan
BSA	Rinder-Serumalbumin
BSS	Balanced Salt Solution (vgl. S. 41)
c-CAP	Collagen-dependent Cell-Attachment Protein
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans
CIG	Kälte-unlösliches Globulin
CM-	Carboximethyl-
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
EACA	ε-Aminocaprinsäure
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure-Natriumsalz
F XIII _a	aktivierter Gerinnungsfaktor XIII
F 'gen	Fibrinogen
F 'in	Fibrin
FKS	foetales Kälberserum
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
KIU	Kallikrein-Inhibitor-Unit (Einheit für Proteinaseinhibitor aus Rinderlunge, Trasylol)
NIH	Einheit des National Institute of Health für Thrombin
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (vgl. S. 26)
PCMB	p-Chlor-Mercuribenzoessäure-Natriumsalz
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	nicht-ionisches Detergens

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

A. EINFÜHRUNG	1
I. Allgemeiner Teil	1
1. Blut - Plasma - Serum	1
2. Die hochmolekularen Plasmabestandteile	3
II. Spezieller Teil	4
1. Fibrinogen	4
1.1 Molekularer Aufbau	5
1.2 Isolierung von Fibrinogen	7
1.3 Heterogenität von Fibrinogen	8
1.4 Plasminolyse von Fibrinogen	11
1.5 Umwandlung in Fibrin	13
2. Kälte-unlösliches Globulin (CIG)	16
B. PROBLEMSTELLUNG	21
C. EXPERIMENTELLER TEIL	23
I. Darstellung gereinigter Proteine	23
1. Fibrinogen	23
2. Kälte-unlösliches Globulin (CIG)	23
3. Kollagen	24
II. Darstellung der Protein-Sepharosen	24
1. Aktivierung der Sepharose	24
2. Immobilisierung der Proteine	25
2.1 Fibrinogen und Fibrinmonomer	25
2.2 Natives Kollagen Typ I und III	26
2.3 Denaturiertes Kollagen Typ I	27
2.4 CIG	27

III. Chromatographische Methoden	27
1. Affinitätschromatographie	27
2. Ionenaustauschchromatographie	28
3. Molekularsiebchromatographie	29
IV. Analytische und immunologische Methoden	30
1. Konzentrationsbestimmung	30
2. Bestimmung der Gerinnbarkeit	30
3. SDS-Gelelektrophorese	31
4. Aminosäureanalyse	32
5. Geldiffusion	32
6. Immunelektrophorese	32
V. Serologische Methoden	33
1. Darstellung von Antisera	33
2. Passive Hämagglutination	34
VI. Spaltungsreaktionen	35
1. Reduktive Spaltungen	35
1.1 Vollständige Reduktion	35
1.2 Partielle Reduktion in Gegenwart von Harnstoff	35
1.3 Partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff	35
1.4 Carboximethylierung	36
1.5 Aminoäthylierung	36
2. Fragmentierungsreaktionen	37
2.1 Plasminolyse	37
2.2 Bromcyan-Abbau	37
VII. Protein-Bindungssysteme	38
1. Radio-immunologischer Protein-Bindungstest	38
1.1 Markierung von Proteinen mit ^{125}Jod	39
1.2 Bestimmung von protein-gebundenem ^{125}Jod	40
2. Protein-Sepharose-Beladungstest	40
VIII. Biologische Testsysteme	41
1. Makrophagen-Armierungstest	41
2. Fibroblasten-Anheftungstest	42

I.	Methodische Entwicklungen zur chromatographischen Fraktionierung von Plasmafibrinogen	44
1.	Chromatographische Auftrennung von Rohfibrinogen (Fraktion I-O) an DEAE-Cellulose	45
2.	Affinitätschromatographie von Fraktion I-O an immobilisiertem Fibrinmonomer	50
3.	Chromatographische Aufarbeitung eines an Fibrinogen abgereicherten Plasmaüberstandes auf Restfibrinogen	54
4.	Identifizierung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) als Begleitkomponente von Fibrinogen	56
5.	Schlußbetrachtung	59
II.	Zur Struktur von Fibrinogen und seinen Derivaten	62
1.	Partielle Reduktion in Gegenwart von Harnstoff	62
1.1	Methode	63
1.2	Albumin als Modellsubstanz	65
1.3	Anwendung auf Fibrinogen	68
2.	Charakterisierung von kovalenten Fibrinogen-Albumin-Assoziaten	71
2.1	Immunologische Untersuchungen an Fibrinogen-Albumin-Komplexen	72
2.2	Partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff	76
3.	Eingrenzung der Haftstelle von Fibrinogen zu Fibrinmonomer	78
III.	Zur Wechselwirkung von Fibrinogen und Fibrinmonomer mit Kollagen	84
1.	Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen verschiedenen Typs	84
1.1	Plasma ohne Thrombininkubation	84
1.2	Plasma nach limitierter Thrombininkubation	86
1.3	Gereinigtes Fibrinogen	88

1.4	Eingrenzung der Haftstelle von Fibrinogen zu Kollagen	89
1.5	Vergleich der Affinität Fibrinogen / Kollagen und Fibrinogen / Fibrinmonomer	93
1.6	Präparative Reinigung von Fibrinogenfraktionen	94
IV.	Reindarstellung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG)	95
1.	Gewinnung angereicherter CIG-Fraktionen	95
2.	Endreinigung	98
3.	Charakterisierung	101
3.1	Vollständige Reduktion in Gegenwart von Harnstoff	101
3.2	Aminosäurezusammensetzung	102
V.	Zur Struktur von CIG	104
1.	Einbau von ^{14}C -Putrescin	104
2.	Plasminolyse	106
3.	Eingrenzung der F XIII-sensitiven Region	109
4.	Immunologische Untersuchungen	114
VI.	Zur Wechselwirkung von CIG mit Matrixsubstanzen	117
1.	Lösliches Fibrinmonomer und Fibrinogen	118
1.1	Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie	118
1.2	Protein-Sepharose-Beladungstest	121
1.3	Agglutination von Fibrinogen- und Fibrinmonomer-beladenen Erythrocyten durch CIG	123
1.4	Fibrinmonomer und Fibrinogen im Bindungstest mit CIG	124
2.	Kollagen	126
2.1	Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie	126
2.2	Beladung von immobilisiertem CIG mit Kollagen	128
2.3	Agglutination von Kollagen-beladenen Erythrocyten durch CIG	131
2.4	Kollagen im Bindungstest mit CIG	132

VII. Biologische Funktionen von CIG	134
1. Zur Verwandtschaft von CIG und "Anti-Gelatine-Faktor (AGF)"	135
1.1 Reindarstellung von AGF	136
1.2 Charakterisierung von AGF	142
1.3 AGF im Gelatine-Bindungstest	145
1.4 Makrophagen-Armierungstest	147
2. Zur Verwandtschaft von CIG und "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)"	148
2.1 Charakterisierung einer c-CAP-Fraktion	149
3. CIG als Haftungs-vermittelnder Faktor für Fibroblasten auf einer Fibrinmatrix	151
E. DISKUSSION	155
F. ZUSAMMENFASSUNG	171
G. LITERATUR	175
ANHANG	

A. EINFÜHRUNG

I. Allgemeiner Teil

1. Blut - Plasma - Serum

Bei den höher organisierten Tierspezies entwickelte sich im Zuge der Evolution ein weit verzweigtes Gefäßsystem, in dem eine im Laufe der Zeit immer komplexer werdende Flüssigkeit, das Blut, die Transportfunktion übernahm.

Im höchst entwickelten Lebewesen, dem Menschen, hat Blut vier Hauptfunktionen zu erfüllen. Zum ersten dient es dem Stofftransport. Dazu gehört die Versorgung der Körperzellen mit den zur Erhaltung und Vermehrung notwendigen Stoffen, die Zuführung des für die Zellatmung notwendigen Sauerstoffs, sowie die Beseitigung von Abfallstoffen und Giften. Die zweite Funktion des Blutes ist eine Abwehrfunktion, die teils durch spezifische Antikörper, teils durch im Blut kreisende zelluläre Bestandteile erreicht wird. Weitere wichtige Aufgaben des Blutes sind seine Pufferfunktion, durch die die Wasserstoffionen-Konzentration konstant gehalten wird, und die Thermoregulation, die beim Warmblütler das Temperaturgefälle zwischen Körperinneren und Oberfläche ausgleicht.

Durch Zentrifugation läßt sich Blut in einen partikulären und in einen flüssigen Anteil, das Plasma, trennen. Der partikuläre Anteil enthält die Erythrocyten, die über das Hämoglobin im Inneren den Sauerstoff- und Kohlendioxid-Transport übernehmen, und an ihrer Oberfläche die stark antigenen Blutgruppensubstanzen tragen. Daneben besteht er aus Leukocyten, die vor allem für die zellvermittelte Immunabwehr zuständig sind, und aus Thrombocyten, denen physiologische Bedeutung beim primären Wundverschluß zukommt.

Plasma ist eine gelbliche, kolloidale Flüssigkeit mit einem Proteinanteil von 7 - 8 %. Mehr als die Hälfte davon

macht das Albumin aus, das zur Osmoregulation, zum Transport von Enzymen und Hormonen und als Proteinreserve dient. Daneben beinhaltet es eine Reihe verschiedener Immunglobuline, Faktoren des Kinin-, des Komplement- und des Gerinnungssystems, sowie andere Glyco- und Lipoproteide, deren Bedeutung und Funktion noch nicht einwandfrei geklärt sind.

Aufgrund der vielfältigen lebensnotwendigen Aufgaben des Blutes bedeutet ein größerer Blutverlust eine lebensbedrohende Gefahr für den Organismus. Schutz vor Blutverlust, meist als Folge von Gefäßverletzungen, bietet das Gerinnungssystem, das, über einen komplizierten Kaskadenmechanismus aktiviert, in seiner Endphase die Wunde verschließt und die Blutung stoppt.

Gerinnung und damit die Ausbildung unlöslicher Anteile tritt ein, wenn man Blut oder Plasma an der Luft stehen läßt. Nach Zentrifugation erhält man Serum, eine Flüssigkeit, die sich von Plasma durch das Fehlen der gerinnbaren Komponente, dem Fibrinogen, unterscheidet. Im Gegensatz zu Plasma enthält Serum verschiedene Gerinnungsfaktoren in aktivierter Form. Um Blut oder Plasma haltbar zu machen, d. h. die Gerinnung zu unterdrücken, werden Stabilisatoren (Citrat, Oxalat, Phosphat, EDTA etc.) zugesetzt. Damit werden einige Ca^{2+} -abhängige Reaktionsschritte innerhalb der Gerinnungskette abgeblockt.

Zur analytischen Charakterisierung individueller Plasmen bzw. Seren bedient man sich heute in erster Linie elektrophoretischer Methoden (Elektrophorese auf Celluloseacetat, Agar etc., eindimensional und zweidimensional), immunologischer Diffusionstechniken (radiale Immundiffusion etc.) oder oft Kombinationen beider Verfahren (Immunelektrophorese, Laurell-Elektrophorese etc.). All diese Techniken lassen Rückschlüsse auf die quantitative Verteilung einzelner Bestandteile zu und sind von enormer Bedeutung in der klinischen Diagnostik.

2. Die hochmolekularen Plasmabestandteile

Für die präparative Fraktionierung der Plasmaproteine ist die fraktionierte Fällung, die sich auf eine unterschiedliche Löslichkeit der verschiedenen Komponenten stützt, die Methode der Wahl. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeiten von Cohn et al. (1-2) aus den Kriegs- und ersten Nachkriegsjahren verwiesen, in denen erstmals verschiedene Plasmafraktionen aufgrund ihrer Löslichkeit in Äthanol-Wasser-Gemischen unterschieden wurden. Diese klassische Fraktionierung hat auch heute noch beträchtliche präparative Bedeutung neben den neueren Aufarbeitungsmethoden durch Fällung mit Ammoniumsulfat, Kochsalz, Polyäthylenglycol oder Glycin.

Für die vorliegende Arbeit, die sich neben Fibrinogen mit einer hochmolekularen, nicht fibrinogenen Komponente beschäftigt, welche bei der Fraktionierung von Plasma eng vergesellschaftet mit fibrinogenem Material auftritt, interessiert vor allem Cohn-Fraktion I. Sie stellt den Anteil der Plasmaproteine dar, der nach Zugabe von Äthanol bis zu einer Konzentration von 8 - 10 % (v/v) bei -3°C , pH 7.2 und einer Ionenstärke von 0.14 ausfällt. Cohn-Fraktion I enthält vor allem die hochmolekularen Plasmabestandteile (Molekulargewicht $> 3 \times 10^5$) geringerer Löslichkeit, in der Hauptsache Fibrinogen und seine Derivate. Daneben finden sich eine Reihe anderer hochmolekularer Komponenten, die von fibrinogenem Material adsorbiert werden können. Diese Rohfraktion dient bis heute als Ausgangsmaterial zur Reindarstellung von Fibrinogen aus Plasma.

Ein gewisser Anteil von Cohn-Fraktion I zeigt eine solch geringe Löslichkeit, daß er bereits beim Stehen in der Kälte präzipitiert, während der größte Teil des Fibrinogens in Lösung bleibt. Der Kälte-Niederschlag enthält einerseits Anteile fibrinogenen Materials, das bereits teilweise in Fibrin übergeführt wurde und in Form von hochmolekularen Komplexen vorliegt. Andererseits treten darin andere hochmolekulare Proteine wie Gerinnungsfaktor VIII, α_2 -Makroglobulin

und eine Komponente auf, die als Kälte-unlösliches Globulin (CIG) bezeichnet wird.

Von den Bestandteilen der Cohn-Fraktion I ist Fibrinogen aufgrund seiner zentralen Stellung innerhalb des Gerinnungssystems am besten untersucht. Die weiteren Komponenten sind erst in den letzten Jahren bearbeitet worden und bislang größtenteils unvollständig charakterisiert. Dies trifft vor allem für das Kälte-unlösliche Globulin (CIG) zu, über das sich der Erkenntnisstand erst während der experimentellen Durchführung der vorliegenden Arbeit entwickelt hat. Die Erforschung dieses humoralen Faktors bleibt dabei eng mit Arbeiten über fibronogenes Material verbunden, da immer neue biologische Zusammenhänge zwischen Gerinnungssystem und CIG zutage treten.

Aus diesem Grund wird zunächst über den Stand der Forschung von Fibrinogen berichtet und anschließend eine Einführung zum Kälte-unlöslichen Globulin (CIG) gegeben.

II. Spezieller Teil

1. Fibrinogen

Fibrinogen ist ein lösliches Plasmaprotein, welches beim Auftreten einer Gefäßverletzung über einen komplizierten Mechanismus in Fibrin umgewandelt wird. Fibrin scheidet sich in Form von unlöslichen Fibrillen, die sich zu gelartigen Strukturen zusammenlagern, am Ort der Wunde ab und verschließt dadurch, zusammen mit aggregierenden Blutplättchen, das beschädigte Gefäß.

Fibrinogen (Übersicht siehe 3) ist ein globuläres Glycoprotein vom Molekulargewicht 3.4×10^5 , das in den Parenchymzellen der Leber synthetisiert wird und im Plasma zu einer Konzentration von 200 - 300 mg% auftritt. Sein Anteil beträgt etwa 4 % der gesamten Plasma-Eiweißkörper. Elektro-

phoretisch verhält sich Fibrinogen wie ein β -Globulin.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hall und Slayter (4) lassen einen Aufbau aus drei aneinander gereihten, globulären Einheiten erkennen, die durch dünne Stränge miteinander verbunden sind. Im hydratisierten Zustand dürfte dem Molekül nach Angaben von Bachmann et al. (5) eine zylindrische Form zukommen, wie aus Untersuchungen mittels Gefrierätztechnik von Fibrinogenlösungen hervorgeht. In dieselbe Richtung weisen Daten aus physikalisch-chemischen Messungen (6-7).

1.1 Molekularer Aufbau

Das Fibrinogenmolekül besteht aus drei paarweise vorkommenden Peptidketten, die mit $A\alpha$, $B\beta$ und γ bezeichnet werden. A und B sind kurze, stark negativ geladene Extensionen der α - und β -Ketten, welche im Zuge der Gerinnung abgespalten werden (8-10). Das gebildete Fibrin ist ebenfalls aus zwei α -, β und γ -Ketten aufgebaut. Die Molekulargewichte der Untereinheiten werden zu 6.5×10^4 , 5.5×10^4 und 4.8×10^4 angegeben (11). Die Aminosäuresequenz der γ -Kette von Fibrinogen ist vollständig (12), die der α - und β -Kette nur teilweise aufgeklärt (13-15). Durch die paarweise Anordnung der drei Peptidketten bekommt das Fibrinogenmolekül einen symmetrischen Aufbau (16-17), wie er in Abb. 1 dargestellt ist.

Alle sechs Untereinheiten von Fibrinogen sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (18-19). Diese Disulfidbindungen sind an bestimmten Stellen des Moleküls kumuliert. So sind die N-terminalen Enden sämtlicher Ketten durch einen Disulfidknoten im Inneren des Fibrinogenmoleküls zusammengehalten (20). Dieser Bereich enthält 11 Disulfide in enger räumlicher Nachbarschaft (21). Daneben findet sich in den äußeren Teilen des Moleküls symmetrisch angeordnet je ein Disulfid-Bereich, durch den die drei Ketten untereinander verbunden sind (16-17,21).



Abb. 1 Schematische Struktur des Fibrinogens in Anlehnung an Marder et al. (16) und Pizzo et al. (17).

Nach Einbeziehung neuester Sequenzdaten (12-15) sind die in ihrer Lage gesicherten interchainaren Disulfidbindungen als dicke Striche, die nicht ganz gesicherten als feine Striche dargestellt. Ebenso sind die intrachainaren Disulfidschleifen als dicke oder feine Kästchen gezeichnet.

Von besonderem Interesse ist, daß die A α -Ketten nur in ihrer N-terminalen Hälfte mit dem übrigen Molekül durch Disulfidbrücken verbunden sind (16-17,22). Die C-terminale Hälfte ist nur mehr durch Nebenvalenzkräfte fixiert, wenn nicht gar frei beweglich. Diese losen Bereiche der A α -Ketten sind einem Abbau durch verschiedene Proteasen leicht zugänglich (23). Neueste Sequenzdaten zeigen, daß auch am C-Terminus der γ -Ketten ein Bereich von etwa 200 Aminosäuren nicht mehr durch Cystinbrücken mit dem übrigen Molekül verbunden ist (12). In den freien Enden dieser Ketten, jedoch auch in nicht sequenzierten Teilen des restlichen Fibrinogenmoleküls finden sich eine Reihe von intrachainaren Disulfidschleifen, deren Bedeutung noch nicht erkannt ist.

1.2 Isolierung von Fibrinogen

Als Standardverfahren zur Gewinnung hochgereinigten Fibrinogens aus Cohn-Fraktion I (1) hat sich die Aufarbeitung nach Blombäck und Blombäck etabliert (24). Sie nutzt die Beobachtung, daß Glycin die Löslichkeit von Fibrinogen erniedrigt, während es die von anderen Plasmaproteinen erhöht. Die einzelnen Fällungsschritte dieser Methode sind in Abb. 2 aufgeführt.

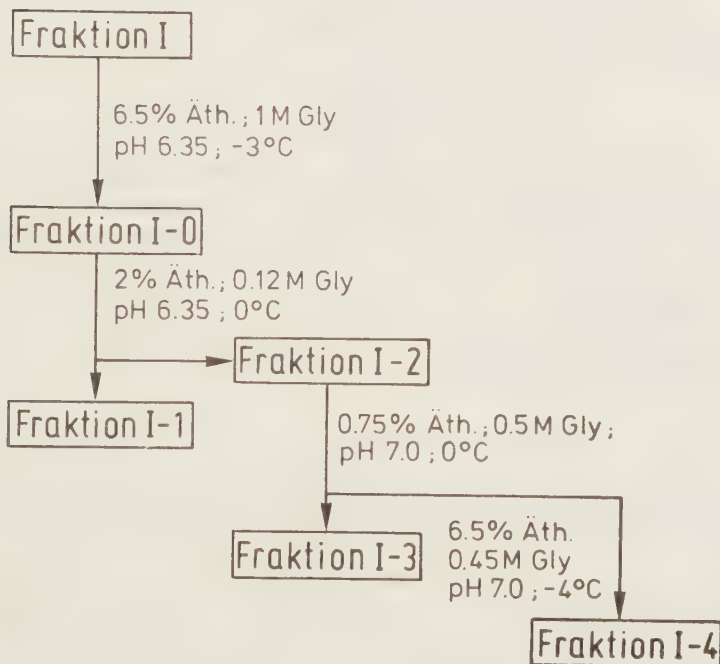


Abb. 2 Darstellung von Fibrinogen nach Blombäck und Blombäck (24).

Ausgangsmaterial ist Fraktion I, die nach Cohn et al. (1) aus Plasma durch Ausfällung mit 8 - 10 % Äthanol bei -3 °C gewonnen wird. Fraktion I-1 wird zur Darstellung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) verwendet (vgl. ERGEBNISSE, Abschnitt IV.1)

Cohn-Fraktion I wird zunächst zweimal mit einem Glycin-Äthanol-Gemisch extrahiert, wobei die Glycinkonzentration so gewählt ist, daß Fibrinogen nahezu ungelöst verbleibt, während nicht fibrinogenes Material in Lösung geht. Zur weiteren Reinigung dieser mit I-O bezeichneten Fraktion werden die kalt-unlöslichen Anteile (Fraktion I-1) nach Äthanol-fällung bei hoher Ionenstärke in der Kälte abgetrennt. Aus der so zugänglichen Fraktion I-2 wird nach Entfernung Materials geringerer Löslichkeit (Fraktion I-3) bei niedriger Ionenstärke hochgereinigtes Fibrinogen als Fraktion I-4 präzipitiert. Diese Fraktion besteht aus intaktem, nativem Fibrinogen einer Gerinnbarkeit von 95 - 97 % und macht etwa 30 - 40 % des gesamten Plasmafibrinogens aus (25).

1.3 Heterogenität von Fibrinogen

Die im Blut gesunder Menschen kreisende Gesamtfibrinogen-Fraktion ist nicht einheitlich, sondern enthält verschiedene Derivate, die sich in Gerinnungsfähigkeit und Löslichkeit von Normalfibrinogen (Fraktion I-4) unterscheiden. Es finden sich Spezies, die schon beim Stehenlassen in der Kälte präzipitieren (1,26-28), neben anderen, die noch in gesättigten Glycinlösungen löslich sind.

Zur präparativen Isolierung der leichter löslichen Fibrinogenfraktionen wurde von Mosesson und Sherry (29) ein auf fraktionierter Äthanol-Glycin-Fällung basierendes Aufarbeitungsschema angegeben. Hierbei werden die verschiedenen leichter löslichen Derivate im Überstand der Fraktion I-2 angereichert, welcher dann in die Fraktionen I-5 bis I-9 aufgetrennt werden kann. Diese Fraktionen stellen angereicherte Gemische der einzelnen Derivate dar, wobei die Löslichkeit der Fraktion mit der ihr zugeordneten Nummer ansteigt. Der Fällungsgang ist in Abb. 3 angezeigt.

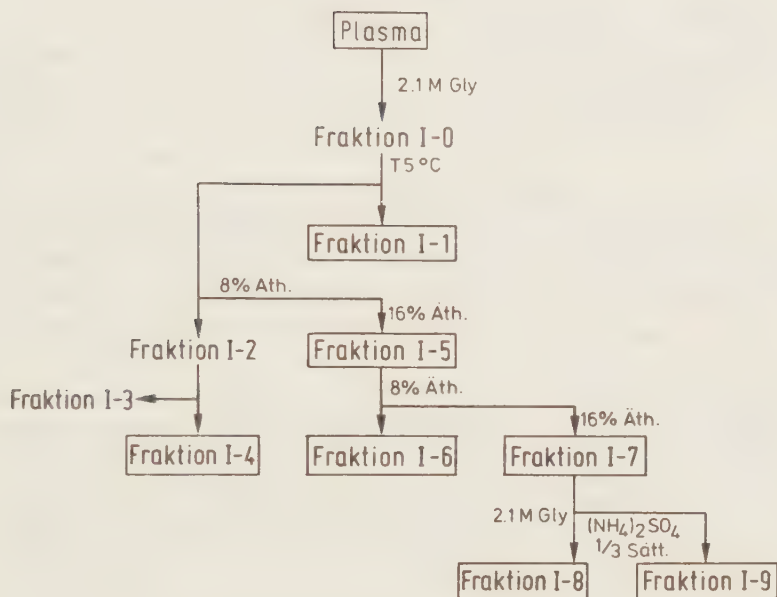


Abb. 3 Fällungsschema zur Gewinnung verschiedener Fibrinogen-Fraktionen nach Mosesson und Sherry (29).

Fibrinogene höherer Löslichkeit finden sich auch im Plasmaüberstand, der nach Abtrennung von Cohn-Fraktion I oder nach Fällung der Hauptmenge von Fibrinogen mit 2.1M Glycin verbleibt (29,32). Jilg et al. (33) isolierten aus diesem Plasmaüberstand weiteres gerinnbares Material, das bis zu 10 % des gesamten Plasmafibrinogens betrug.

Parallel mit der erhöhten Löslichkeit nimmt das Molekulargewicht dieser Fibrinogen-Derivate ab (32,34). Nach An-

gaben von Sherman et al. (35) kommt der Fraktion I-8 ein Molekulargewicht von 2.8×10^5 zu, während das von Normalfibrinogen bei 3.4×10^5 liegt. Wuppermann und Hörmann fanden für Fraktion I-9 aus Rinderplasma einen Wert von 2.8×10^5 (30), für Fraktion I-6 wurde ein Molekulargewicht von 2.45×10^5 bestimmt (31). Ein leichter lösliches Fibrinogenderivat aus dem Überstand nach Fällung von Plasma mit 2.1M Glycin unterschied sich in der Größe nur geringfügig von Normalfibrinogen (38).

Die Kettenzusammensetzung der Fibrinogene höherer Löslichkeit weicht deutlich von der von Normalfibrinogen ab (32-34). Verglichen mit letzterem, das reduziert nach SDS-Gelelektrophorese die drei intakten Untereinheiten $A\alpha$, $B\beta$ und γ ergibt, findet man für die leichter löslichen Fraktionen nur intakte β - und γ -Ketten. In Fraktion I-6 ist bereits ein Großteil der α -Ketten auf die Länge der β -Ketten verkürzt (32), in Fraktion I-9 treten sie nur mehr als Stummel vom Molekulargewicht 2×10^4 auf (32,34). Je nach Abbaugrad der α -Ketten ist die Thrombinzeit, die als Maß für die Gerinnungsfähigkeit dient, bei den leichter löslichen Derivaten gegenüber Normalfibrinogen stark verlängert (29).

Sherman et al. (35) erbrachten den Beweis, daß sich die leichter löslichen Fibrinogene nur in C-terminalen Aminosäuren der α -Kette, nicht jedoch vom N-Terminus her, unterscheiden. Sie konnten zudem in-vitro zeigen, daß Normalfibrinogen durch limitierte Plasminbehandlung in verschiedene leichter lösliche Derivate überführt werden kann, ehe das Fragment X der Plasminolyse (vgl. Abschnitt II.1.4) entsteht. Außerdem gelang es Gollwitzer et al. (36) in jüngster Zeit, im Serum Bruchstücke aus der C-terminalen Region der α -Kette von Fibrinogen nachzuweisen.

Man ist deswegen heute der Ansicht, daß die in-vivo auftretenden, leichter löslichen Derivate durch partielle Proteolyse aus Normalfibrinogen hervorgegangen und mit ihrem An-

teil von etwa 20 % (29) am gesamten Plasmafibrinogen als natürliche Kataboliten der Muttersubstanz anzusehen sind.

1.4 Plasminolyse von Fibrinogen

Plasmin ist eine relativ unspezifische Endopeptidase, die im Plasma als inaktive Vorstufe, dem Plasminogen, vorhanden ist (Übersicht siehe 37). Seine Aktivierung kann entweder autokatalytisch, durch verschiedene Gewebsfaktoren, durch Urokinase, Streptokinase oder eine Reihe anderer Proteasen erfolgen. Neben verschiedenen Plasmaproteinen stellen vor allem Fibrinogen und Fibrin wichtige Substrate dieser Protease dar. Ihre physiologische Bedeutung liegt in diesem Zusammenhang in der Kontrolle des "Hämostatischen Gleichgewichtes" von Gerinnung und Fibrinolyse (38).

Nach Vorstellung von Marder et al. (16) und Pizzo et al. (17) läuft der Plasminabbau von Fibrinogen und löslichem Fibrin nach dem in Abb. 4 dargestellten Schema ab. Aufgrund der mangelnden Spezifität von Plasmin treten die Hauptfragmente X, Y, D und E nicht als einheitliche Fraktionen, sondern als heterogene Populationen auf (39).

Der proteolytische Angriff erfolgt vom C-terminalen Ende der A α -Ketten von Fibrinogen (39,16-17) und führt über verschiedene partiell abgebaute Fibrinogenderivate (vgl. Abschnitt II.1.3) nach zusätzlicher Verkürzung der B β -Kette an ihrem Aminoende zum Fragment X. Sein Molekulargewicht bewegt sich zwischen 2.4 und 2.6×10^5 . Nach fortschreitender Spaltung wird aus Fragment X je ein Fragment Y (Molekulargewicht etwa 1.5×10^5) und ein Fragment D (Molekulargewicht 8.5×10^4). Bei Fragment Y ist neben der A α - und B β -Kette auch die γ -Kette teilweise verkürzt; Fragment D enthält alle drei Untereinheiten in weitgehend abgebauter Form. Im letzten Abschnitt der Plasminolyse wird Fragment Y dann noch in je ein Fragment D und ein Fragment E (Molekulargewicht etwa 5×10^4) gespalten. Letzteres beinhaltet den N-terminalen Disulfidknoten aus dem Inneren des Moleküls und ist besonders reich

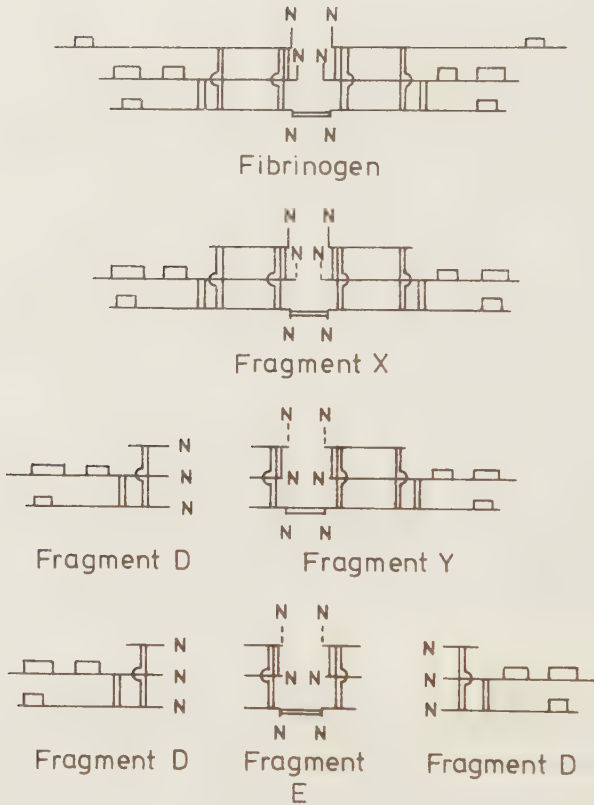


Abb. 4 Plasminolyse von Fibrinogen in Anlehnung an Marder et al. (16) und Pizzo et al. (17)

In der Anordnung der Disulfidbindungen sind die neuesten Sequenzdaten (12-15) berücksichtigt.

an Disulfidbindungen (21). Die beiden äußeren Disulfidregionen des Fibrinogenmoleküls sind in den Fragmenten D enthalten (16-17).

Im Zuge fortschreitender Proteolyse nehmen die Molekulargewichte der späten Spaltprodukte D und E noch etwas ab (16-17). Für Fragment D ist gezeigt, daß dabei nur das Teilstück der D_{γ} -Kette verkürzt wird (40-41).

Fragment X ist noch teilweise gerinnbar. Fragment Y ist aufgrund seiner assymmetrischen Struktur ein starker Hemmstoff der Gerinnung. D und E wirken nur schwach gerinnungshemmend. Die frühen Plasminolyse-Fragmente X und Y können vom sich ausbildenden Gerinnsel adsorbiert werden (42), während D und E weitgehend in Lösung bleiben (43).

Mosesson et al. (44) haben gezeigt, daß Fragment X, welches beim Abbau von Fibrinogen entsteht, noch die Fibrinopeptide A und B trägt, während das beim Abbau von löslichem Fibrin erhaltene die N-terminalen Extensionen nicht mehr enthält. Die übrigen Spaltprodukte aus Fibrinogen und löslichem Fibrin sind als weitgehend identisch erkannt worden.

1.5 Umwandlung in Fibrin

Der eigentliche Gerinnungsvorgang steht am Ende einer komplizierten Reaktionskette, die auf verschiedenen Wegen eingeleitet werden kann. Die Bedeutung der Blutgerinnung liegt in der Bildung eines Gerinnsels, das eine Wunde bald nach ihrer Entstehung verschließt. Dazu wird das im Plasma kreisende, lösliche Fibrinogen in ein unlösliches Fibrin-Fasernetzwerk überführt. Hierbei werden im wesentlichen die drei in Abb. 5 dargestellten Phasen durchlaufen.

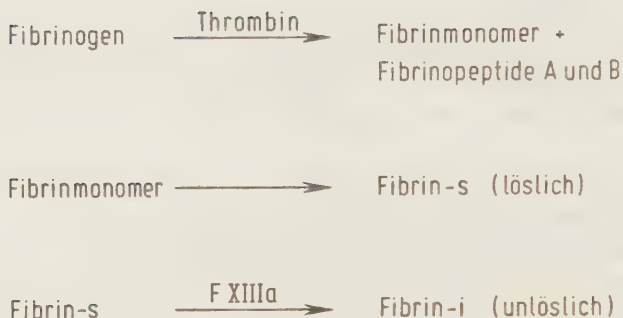


Abb. 5 Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin

Unter Abspaltung der sauren Fibrinopeptide A und B durch die Protease Thrombin werden zunächst diskrete Fibrinmonomere gebildet (8-10). Die damit verbundene Ladungsveränderung führt zu einer Streckung des Restmoleküls (45), wodurch ein Affinitätszentrum freigelegt wird, das Fibrinmonomer zur Interaktion untereinander, aber auch zur Wechselwirkung mit Fibrinogen befähigt (46).

Als Folge dieser Aggregationsneigung lagern sich in der zweiten Phase Fibrinmonomere zu fibrillären Polymeren aneinander, wobei sich schließlich hochgeordnete Fibrinfibrillen mit einer elektronenmikroskopisch sichtbaren Querstreifung ausbilden (47). In diesem Stadium ist das polymere Fibrin noch löslich in lyotropen Medien wie 5M Harnstoff, 1M KBr, 0.02 % Essigsäure etc.

Im letzten Schritt wird Fibrin-s (s für soluble) unter Einwirkung von aktiviertem Gerinnungsfaktor XIII (F XIII_a) in kovalent vernetztes Fibrin-i (i für insoluble) überführt (51), welches nur mehr unter reduktiven Bedingungen, nicht mehr

mit lyotropen Puffern, in Lösung zu bringen ist (52-54).

Die Ausbildung von Quervernetzungen im Fibrin-s erfolgt durch intermolekulare Transamidierung, in deren Verlauf ein befähigter Glutaminrest (Akzeptor) des einen Fibrinmonomeren mit der ϵ -Aminogruppe eines geeigneten Lysinrestes (Donor) eines anderen Fibrinmonomeren unter Abspaltung von Ammoniak amidartig verknüpft wird (55-57). Abb. 6 zeigt den molekularen Mechanismus der Transamidierungsreaktion.

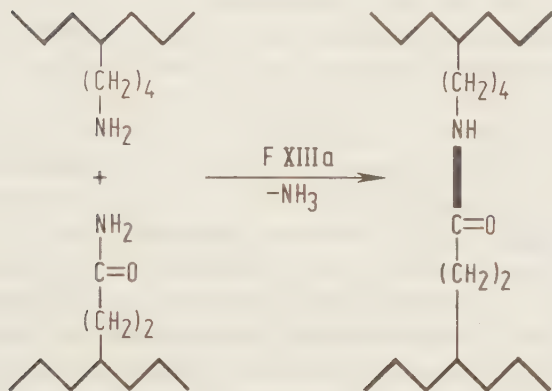


Abb. 6 Schema zur F XIII_a-katalysierten Transamidierungsreaktion (55-57).

In Gegenwart von geeigneten primären Aminen (Glycinmethylester, Putrescin, Cadaverin etc.) tritt keine intermolekulare Vernetzung unter Mitwirkung von F XIII_a ein (58-60). In diesem Fall wirkt der niedrigmolekulare Ligand als Pseudodonor und wird in einer rascheren Reaktion kovalent an die Glutamin-Akzeptorgruppe gekoppelt.

Gerinnungsfaktor XIII (Übersicht siehe 61) ist ein Fibrinogen-affines Plasmaprotein vom Molekulargewicht 3.2×10^5 , das ebenfalls in der Cohn-Fraktion I (1) gefunden wird. Es besteht aus zwei nicht identischen Untereinheiten A (Molekulargewicht 7.5×10^4) und B (8.8×10^4), die paarweise vorkommen, aber im Vergleich zu Fibrinogen von nicht kovalenten Bindungen zusammengehalten sind (62). In Gegenwart von Thrombin, Calciumionen und katalytischen Mengen von SH-Verbindungen wird Gerinnungsfaktor XIII zu einer hochspezifischen Transglutaminase aktiviert, die zwischen Fibrinmonomeren amidartige Quervernetzungen ausbildet und zur mechanischen Verfestigung des Gerinnsels beiträgt (63-66). Neben Plasma-Transglutaminase wurde ein ähnlicher Faktor auch auf Plättchen und in der Placenta nachgewiesen und charakterisiert (64,67-68). Mangel an Gerinnungsfaktor XIII zieht schwer stillbare Blutungen und Wundheilungsstörungen nach sich (69-71).

Gerinnung und Fibrinolyse bilden die Grundlage des "Hämostatischen Gleichgewichtes" (38), das die Blutzirkulation innerhalb eines weiten Bereiches gewährleistet. Die Steuerung der beiden gegeneinander ablaufenden Vorgänge geschieht durch ein Zusammenspiel spezifischer Inhibitoren. So wird die Aktivierung beider Systeme an verschiedenen Stellen reguliert (Übersicht siehe 72). Antithrombin III ist direkt gegen Thrombin gerichtet, während Heparin auf der Stufe der Prothrombinbildung eingreift. Andererseits wird Plasmin direkt durch α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin abgeblockt.

2. Kälte-unlösliches Globulin (CIG)

In der Cohn-Fraktion I aus Plasma (vgl. Abschnitt I. 2) tritt neben Fibrinogen/Fibrinmonomer und Gerinnungsfaktor XIII ein weiterer hochmolekularer Bestandteil (73) auf, der lange Zeit als Fibrinogen-verwandtes Material angesehen wurde (74-75) ehe von Pollara (76) mittels immunologischer Methoden und Vergleich der N-terminalen Endgruppen gezeigt wurde, daß es sich um ein eigenständiges Plasmaprotein

handelt. Aufgrund seines Auffindens in den schwerer löslichen Anteilen von Cohn-Fraktion I und seiner Eigenart, zusammen mit fibrinogenem Material in der Kälte zu präzipitieren, wurde dieser Plasmabestandteil als "Kälte-unlösliches Globulin (CIG)" (73) bezeichnet. Das Protein wurde erstmals von Moseson und Umfleet (77) aus Plasma-Cryopräzipitaten in reiner Form dargestellt und partiell charakterisiert.

CIG besitzt im nativen Zustand ein Molekulargewicht von etwa 4.4×10^5 . Nach Reduktion in Gegenwart von Harnstoff zerfällt das Molekül in zwei, offensichtlich identische, Untereinheiten vom Molekulargewicht 2.2×10^5 (77-78). Als Glycoprotein weist es einen Gesamtzuckeranteil von etwa 5 % auf, wovon 1.2 % Sialinsäure, 1.8 % Hexosen und 2.1 % Hexosamine sind (79). Die beiden Peptidketten tragen N-terminal Pyrrolidoncarbonsäure (78). Bezüglich der C-terminalen Aminosäuren wurde, ähnlich wie beim Fibrinogen, eine Heterogenität beschrieben, die auf partielle Proteolyse zurückgeführt wird (78-80).

Elektrophoretisch wandert Kälte-unlösliches Globulin mit der Mobilität eines schnellen β -Globulins. Sein Gehalt im Plasma beträgt etwa 30 - 60 mg% (77-78). Es macht den Hauptanteil des nichtgerinnbaren Materials der Heparin-präzipitierbaren Fraktion von Plasma aus (81), jedoch ziehen die verschiedenen Krankheitsbilder nur unsignifikante Veränderungen im CIG-Spiegel nach sich. Im Serum hängt die CIG-Konzentration wesentlich von der Temperatur ab, bei der die Gerinnung durchgeführt wurde. Obwohl selbst nicht gerinnbar (73), wird das Protein bei tiefer Temperatur nahezu vollständig vom sich ausbildenden Gerinnsel adsorbiert (73,77, 82-83), wenn nicht gar kovalent unter Mitwirkung von F XIII_a an Fibrin gebunden (78,84-85).

Kälte-unlösliches Globulin (CIG) erfuhr in jüngster Zeit breites Interesse, als Ruoslahti und Vaheri seine Identität mit einem Glycoprotein der Fibroblasten-Oberfläche aufzeigten (86-87). Es wird von diesen Zellen synthetisiert,

erscheint zunächst auf ihrer Oberfläche, wird dann in die Interzellulär-Flüssigkeit abgegeben und gelangt offensichtlich von dort in den Blutkreislauf (87-88).

CIG macht in Fibroblastenkulturen etwa 0.5 - 2 % des gesamten zellulären Proteins, und damit das Hauptglycoprotein der Fibroblasten-Oberfläche aus (86-87). Zelluläre und plasmatische Form zeigen "komplette Identität" ihrer antigenen Determinanten und vergleichbare elektrophoretische Mobilität. Beide Spezies setzen sich aus zwei, über Disulfidbindungen verbrückte Untereinheiten zusammen. Die Einzelketten der zellgebundenen Form scheinen gegenüber der plasmatischen geringfügig verlängert (89-90). Wie das lösliche Fibrin sind beide Spezies zu einer durch F XIII_a-katalysierten Transamidierungsreaktion befähigt (78,84,89-91) (vgl. Abschnitt II.1.5).

Mittlerweile sind eine Vielzahl von Zellen unterschiedlicher Herkunft mittels Immunfluoreszenztechnik und selektiver Markierung der Oberflächenbestandteile auf die Anwesenheit von CIG untersucht worden. Zell-assoziiertes CIG wurde neben Fibroblasten auch auf Astroglialzellen (92), Epithelzellen (93), Myoblasten (94) und glatten Muskelzellen (95) nachgewiesen. Sein Auftreten an der Zelloberfläche scheint von den Phasen des Zellcyclus abzuhängen (96-97), während intrazelluläres CIG stets nachweisbar ist (98). Auf der Oberfläche von B-Lymphocyten ist jedoch ein Protein vergleichbarer Größe gefunden worden, das offensichtlich nicht mit CIG verwandt ist (99).

Als wichtiger Bestandteil der Zelloberfläche ist CIG von einer Vielzahl verschiedener Arbeitsgruppen unter einer Reihe von Bezeichnungen unabhängig voneinander studiert worden. Obwohl die Identität einiger dieser Proteine nicht bis ins letzte aufgezeigt ist, darf aufgrund der bisher bekannten Daten angenommen werden, daß es sich, von geringfügigen Unterschieden abgesehen, tatsächlich um ein und dasselbe Translationsprodukt handelt. In Tab. 1 sind die von den einzelnen Autoren benutzten Namen zusammengefaßt.

Cold-insoluble Globulin (CIG)	Morrison et al., 1948 (73)
Surface-Fibroblast-Antigen (SF)	Ruoslahti et al., 1973 (88)
SF 210 Polypeptide (SF 210)	Vaheri et al., 1975 (100)
Fibronectin	Ruoslahti et al., 1976 (101)
Large external Transformation sensitive Protein (LETS)	Hynes und Bye, 1974 (96)
L 1-Band-Protein	Hogg, 1974 (102)
Cell-Surface-Protein (CSP)	Yamada und Weston, 1974 (103)
Cell-Adhesion-Factor (CAF)	Pearlstein, 1976 (104)
Galactoprotein a	Gahmberg et al., 1974 (105)
Zeta-Protein (Z)	Robbins et al., 1974 (106)
Major-Fibroblast-Glycoprotein	Sear et al., 1976 (107)
Cell-Spreading-Factor (CSF)	Grinnell, 1976 (108)

Tabelle 1 Literaturbezeichnungen für CIG oder CIG-artige
Proteine und ihre Autoren.

Virus-transformierte Zelllinien tragen an ihrer Oberfläche weniger bzw. überhaupt kein CIG (100,102,109-110), verglichen mit den entsprechenden Linien vor der Transformation. Vaheri und Ruoslahtis Beobachtungen zufolge (111), fehlt den meisten transformierten Zellen die Fähigkeit, das Protein an ihrer Oberfläche zu behalten. Adams et al. (112) haben kürzlich gezeigt, daß Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen bereits auf der Ebene der Transkription zutage treten.

Der transformierte Zustand (Übersicht siehe 113) bringt für die Zellen neben einer veränderten Morphologie, einer Tendenz zu unkontrolliertem Wachstum, verbunden mit erhöhtem Glucosetransport (114), auch eine leichtere Agglutinierbarkeit durch pflanzliche Lectine (115-116) mit sich. Normale Zellen weisen nach Behandlung mit Proteasen (117-118) und bestimmten Lectinen (115-116) ein in vielen Punkten den transformierten

Zellen ähnliches Verhalten auf, so daß diese Veränderungen mit dem verminderten Auftreten bzw. Fehlen von CIG auf ihrer Oberfläche in engem Zusammenhang zu sehen sind (119-120).

In der Tat haben Unkeless et al. (121-122) in Kulturen transformierter Zelllinien eine erhöhte proteolytische Aktivität nachgewiesen. Yamada et al. (123-124) und Ali et al. (114) ist es gelungen, den Phänotyp transformierter Zellen durch Zugabe von gereinigtem CIG, das von der Oberfläche normaler Zellen abgelöst worden war, zu ändern, und ihr unkontrolliertes Wachstum bis zu einem gewissen Maße zu korrigieren. Ein Zusatz von Anti-CIG-Antikörpern in Zellmedium egalisiert diesen Effekt und bringt wieder die Merkmale der Transformation hervor (114,124).

B. PROBLEMSTELLUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung und Charakterisierung der verschiedenen Komponenten von angereichertem Plasmafibrinogen. Es galt einerseits natürlich vorkommende Fibrinogenderivate in reiner Form vom Mutterprotein abzutrennen und zu charakterisieren, andererseits sollte die Natur der Beziehung der nicht fibrinogenen Begleitkomponenten zu fibrinogenem Material durchleuchtet werden.

Bei der Fraktionierung von Rohfibrinogen sollten in erster Linie chromatographische Verfahren zur Anwendung kommen. Neben der Chromatographie an Ionenaustauschern war die Methode der Affinitätschromatographie auf ihre Eignung zur Auftrennung von Plasmafibrinogen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollten die im Fibrinogenmolekül zum Tragen kommenden Haftstellen in ihrer Lage auf kleinere Bruchstücke eingegrenzt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen war eine selektive Spaltung von interchainaren Disulfidbindungen zu entwickeln, bei der die intrachainaren Disulfidschleifen erhalten bleiben.

Mit Fortschritt der Arbeit hat die Identifizierung eines hochmolekularen Bestandteils von Rohfibrinogen als "Kälte-unlösliches Globulin (CIG)" zur Erweiterung des ursprünglichen Problemkreises geführt. Neue, entscheidende Gesichtspunkte aus der Literatur um dieses Protein deuteten auf seine wichtige Brückenstellung zwischen Gerinnungs- und Bindegewebssystem hin.

Neben der präparativen Darstellung und proteinchemischen Charakterisierung von CIG sollten Daten zur Struktur und zur Identität mit anderen, nicht hinreichend charakterisierten Serumfaktoren erbracht werden. Im Zusammenhang mit den Funktionen dieses Proteins galt es, die Region auf kleine Bruchstücke einzugrenzen, die zur F XIII_a-katalysierten Transamidierungsreaktion befähigt ist. Ferner sollte anhand von

Affinitäts- und Bindungsstudien das Verhalten von CIG gegenüber Matrixsubstanzen wie Fibrin und Kollagen untersucht werden. Diese Kenntnisse waren auf Haft- und Adsorptionsprobleme in zellbiologischen Systemen zu übertragen.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Darstellung gereinigter Proteine

1. Fibrinogen

Hochgereinigtes Fibrinogen wurde aus käuflichem Rohfibrinogen (Fibrinogen KABI, Stockholm), das eine Gerinnbarkeit (vgl. Abschnitt IV.2) von etwa 80 % besaß, nach der Methode von Blombäck und Blombäck (24) durch fraktionierte Äthanol-Glycin-Fällung hergestellt. Fraktion I-4 wurde als das Material angesehen, das dem intakten, nativen Fibrinogen entspricht. Sie wies eine durchschnittliche Gerinnbarkeit von 92 % (89 - 93 %) auf. Die beim Fällungsgang abgetrennte Fraktion I-1 wurde zu Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) aufgearbeitet (vgl. Abschnitt I.2), während der Überstand der Fraktion I-2 nach Mosesson und Sherry (29) zur Herstellung leichter löslicher Fibrinogen-Derivate (Fraktion I-5) verwendet wurde.

Eine weitere, selbst entwickelte Darstellungsmethode von sehr sauberem, CIG-freiem Fibrinogen hoher Gerinnbarkeit durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen Typ I nativ wird im Kapitel "ERGEBNISSE" (vgl. Abschnitt III.1.6) vorgestellt. Anhand dieser Methode wurden vor allem Fraktionen aufgearbeitet, wie sie bei der Darstellung von CIG als Gemische von Fibrinogen, Fibrinmonomer und CIG anfielen.

2. Kälte-unlösliches Globulin (CIG)

Die Darstellung von hochgereinigtem CIG erfolgte in Anlehnung an die von Mosesson et al. (77,79) und Chen et al. (80,125) beschriebene Methode. Abweichungen bzw. Verbesserungen sind im Kapitel "ERGEBNISSE" (vgl. Abschnitt IV.1 und 2) aufgeführt.

An derselben Stelle wird auch über ein neu entwickeltes Verfahren zur Darstellung dieses Proteins mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen Typ I nativ berichtet.

3. Kollagen

Kollagen der verwendeten Typen war eine Gabe der Herren Dr. B.C. Adelman, Dr. R.W. Glanville und Dr. R. Timpl aus unserer Abteilung. Kollagen Typ I und III war nach der von Timpl et al. (126) beschriebenen Methode, Typ II nach den Angaben von Miller (127) hergestellt worden. Die Präparate waren Typ-spezifisch und frei von nicht kollagenen Proteinen.

Zur Denaturierung wurden die 0.05 % essigsauren Lösungen der nativen Kollagentypen 40 Minuten bei 50 °C inkubiert. Dieser Vorgang wurde vor jeder Verwendung neu vorgenommen.

II. Darstellung der Protein-Sepharosen

1. Aktivierung der Sepharose

Als Trägermaterial wurde zur Immobilisierung von Fibrinmonomer Sepharose 6B, zur Immobilisierung der verschiedenen Kollagene und von CIG Sepharose 4B (Pharmacia, Frankfurt) verwendet. Die Immobilisierung wurde in Anlehnung an die von Cuatrecasas beschriebene Bromcyan-Methode (128) durchgeführt.

100 ml gepacktes Gel wurde auf der Nutsche zunächst mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen, trocken gesaugt und in 100 ml Wasser suspendiert. Dazu wurden unter Kühlung mit Eiswasser 5 g Bromcyan (Merck AG, Darmstadt) in 100 ml Wasser zugegeben und der pH-Wert, der rasch absinkt, mit konz. NaOH zwischen 11.0 und 11.5 gehalten (Abzug !). Nach etwa 60 Minuten hatte sich der pH-Wert stabilisiert. Die aktivierte Sepha-

rose wurde nun mehrmals mit kaltem Wasser, schließlich mit 500 ml 0.5M NaCl, 0.05M Phosphat, pH 7.4, gewaschen und in 100 ml dieses Puffers suspendiert.

2. Immobilisierung der Proteine

Pro 100 ml Suspension der aktivierten Sepharose wurden 100 ml Proteinlösung der Konzentration 1.5 mg / ml zugefügt und unter Stickstoff 20 Stunden bei 4 °C gerührt. Der Kopplungsvorgang sowie das Waschen des Affinitätsmaterials war bei den einzelnen immobilisierten Proteinen etwas unterschiedlich.

2.1 Fibrinogen und Fibrinmonomer

Gekoppelt wurde zunächst hochgereinigtes, CIG-freies Fibrinogen (Fraktion I-4 oder gereinigtes Fibrinogen aus Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen Typ I nativ), das in der Konzentration von 1.5 mg / ml in 0.5M NaCl, 0.05M Phosphat, pH 7.4, gelöst war. Die erhaltene Fibrinogen-Sepharose wurde anschließend mit verschiedenen Puffern gewaschen:

1. 1.5 Liter 0.5M NaCl, 0.05M Phosphat, pH 7.4
2. 1.5 Liter 0.05M Tris-Phosphat, 1M NaCl, 0.025M EACA, pH 8.6
3. 1.0 Liter des letzten Puffers, jedoch pH 4.2
4. 1.0 Liter 0.1M NaHCO₃, 0.2M Glycin
5. 1.0 Liter 0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3 (Elutionspuffer)
6. 1.0 Liter 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.01M EDTA, 0.001M PCMB, pH 7.6
7. 1.5 Liter Elutionspuffer (siehe 5.).

Die fertige Fibrinogen-Sepharose wurde in Elutionspuffer suspendiert, mit 0.02 % Natriumazid versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Überführung des immobilisierten Fibrinogens in lösliches Fibrinmonomer wurden 100 ml gepackte Fibrinogen-Sephrose mit 1.5 Litern des PCMB-haltigen Puffers (siehe 6.) gewaschen und in 100 ml davon suspendiert. Dazu wurden 100 NIH-Einheiten Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke AG, Marburg) gegeben, die in 10 ml des PCMB-haltigen Puffers (siehe 6.) gelöst waren, und in Gegenwart von 10000 KIU-Einheiten Proteaseninhibitor (Trasylol, Bayer AG, Leverkusen) 3 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde abgenutscht und erneut mit verschiedenen Puffern gewaschen:

8. 1.0 Liter PCMB-Puffer (siehe 6.)
9. 1.5 Liter 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6 (Auftragspuffer)
10. 1.0 Liter Elutionspuffer (siehe 5.)

Die fertige Fibrinmonomer-Sephrose wurde in Elutionspuffer suspendiert, mit 0.02 % Natriumazid versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2 Natives Kollagen Typ I und III

Die Kopplungsbedingungen entsprachen den für Fibrinogen bzw. Fibrinmonomer beschriebenen. Zum Waschen der immobilisierten nativen Kollagene wurden jedoch verwendet:

1. 1.5 Liter 0.5M NaCl, 0.05M Phosphat, pH 7.4
2. 1.0 Liter 3M KSCN in PBS⁺, pH 7.2
3. 1.0 Liter 0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 7.6 (Elutionspuffer)

Das fertige native Kollagenadsorbens wurde in Elutionspuffer suspendiert, mit 0.02 % Natriumazid versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt.

⁺PBS: Phosphat-gepufferte Saline (0.02M PO₄, 0.15M NaCl, pH 7.2)

2.3 Denaturiertes Kollagen

Zur Immobilisierung wurde natives Kollagen zu einer Konzentration von 1.5 mg / ml in 0.05 %iger Essigsäure gelöst und dagegen dialysiert. Die Denaturierung wurde durch Inkubation der sauren Lösung bei 50 °C für 40 Minuten vorgenommen. Anschließend wurde der pH-Wert der Kollagenlösung mit 2N NaOH auf 7.4 gebracht und die Immobilisierung wie im Falle von Fibrinogen durchgeführt. Beim Waschen wurde das Affinitätsmaterial wie natives Kollagenadsorbens behandelt. Aufgrund der starken Renaturierungstendenz von Kollagen Typ III wurde nur Typ I in denaturiertem Zustand immobilisiert.

2.4 CIG

Die Immobilisierung erfolgte wie im Falle des Fibrinogens. Gewaschen wurde wie für natives Kollagen beschrieben, jedoch ohne KSCN-haltigen Puffer.

III. Chromatographische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Trennungen bei Raumtemperatur vorgenommen. Der Proteingehalt der Eluate wurde bei 280 nm in einer optischen Einheit mit Durchflußküvette (Uvichord II, LKB, Stockholm) kontinuierlich gemessen und als % Transmission per Schreiber aufgezeichnet.

1. Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial wurde immobilisiertes Fibrinogen, Fibrinmonomer, Kollagen Typ I- und III-nativ, Kollagen Typ I-denaturiert und CIG verwendet. Chromatographiert wurde unter den von Stemberger und Hörmann (129) beschriebenen Bedingungen. Die zu chromatographierende Proteinfraktion wurde in Auftragspuffer (0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6) bei 4 °C auf die im gleichen Puffer äquilibrierte Säule gebracht und damit weiterdurchströmt, bis eine klare Grundlinie erreicht war (Fraktion A = nicht adsorbiertes Material). Die Desorption erfolgte stufenweise oder kontinuierlich.

Bei der einstufigen Elution wurde die zurückgehaltene Proteinfraktion mit Elutionspuffer (0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3) bei 4 °C desorbiert (Fraktion C).

Bei der zweistufigen Elution wurde dieser Desorption ein Wärmeschritt vorgeschaltet, wobei die Säule auf 37 °C erwärmt und eine zweite, unter physiologischen Bedingungen in der Wärme eluierbare Proteinfraktion (Fraktion B) erhalten wurde. In diesem Falle wurde die Säule nach Erreichen einer klaren Grundlinie wieder 2 Stunden auf 4 °C gekühlt, bevor Fraktion C eluiert wurde.

In einigen Fällen wurde das adsorbierbare Material mittels eines kontinuierlichen, linearen KBr-Gradienten (0.1M gegen 1M KBr) bei 4 °C desorbiert. Für die 0.8 x 20 cm großen Affinitätssäulen mit einem Durchfluß von etwa 20 ml / Std. wurde ein Gradient von 25 ml Startpuffer (0.05M Tris, 0.1M KBr, 0.025M EACA, pH 7.6) gegen 25 ml Limitpuffer = Elutionspuffer (0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3) angelegt. Die Säule war mit bromidhaltigem Startpuffer äquilibriert, die zu chromatographierende Substanz wurde in diesem Puffer gelöst aufgetragen.

Nach der Chromatographie wurden die Affinitätssäulen in Bromid-haltigem Elutionspuffer aufbewahrt und vor Gebrauch mit physiologischem Auftragspuffer äquilibriert. Alle weiteren Angaben betreffend Durchfluß, Säulendimension, aufgetragene Proteinmenge etc. sind den jeweiligen Legenden der Abbildungen zu entnehmen.

2. Ionenaustauschchromatographie

Zur Chromatographie an DEAE-Cellulose wurde ein Material der Fa. Serva, Heidelberg (Servacel, Typ DEAE 23 SS) verwendet. Zur Fraktionierung von Plasmafibrinogen diente das komplette, im Kapitel "ERGEBNISSE" (vgl. Abschnitt I.1) beschriebene abgestufte Gradientensystem. Für die präparative Endreinigung von CIG bzw. AGF wurde dieses Trennsystem

in vereinfachter Form eingesetzt (vgl. Abschnitt IV.2). Alle weiteren Angaben betreffend Durchfluß, Säulendimension, aufgetragene Proteinmenge etc. sind den jeweiligen Legenden der Abbildungen zu entnehmen.

Zur Chromatographie an CM-Cellulose wurde die Cellulose der Fa. Whatman (Typ CM 52) benutzt. Alle Trennungen (reduziert-carboximethylierte Fibrinogen-Einzelketten, CM-Untereinheiten von CIG sowie CM-Albumin) wurden bei 4 °C an einer 0.8 x 25 cm langen Säule mit einem Durchfluß von 12.8 - 13.2 ml / Std. durchgeführt. Die zu trennende Substanz war durch Entsalzung an einer mit Startpuffer (0.005M Natriumacetat in 8M Harnstoff, pH 5.3) äquilibrierten Sephadex G-25-Säule in diesen überführt worden. Nach dem Auftragen der Probe (15 - 25 mg Protein) auf die CM-Säule wurde etwa mit dem 10fachen Säulenvolumen an Startpuffer nachgespült. Danach wurde stets mittels eines linearen Natriumacetat-Gradienten, bestehend aus 100 ml Startpuffer gegen 100 ml Limitpuffer (0.1M Natriumacetat in 8M Harnstoff, pH 5.3) eluiert. Die verwendeten Puffer wurden aus deionisierten Harnstofflösungen immer frisch bereit.

3. Molekularsiebchromatographie

Alle Angaben betreffend Säulenmaterial und -dimension, Elutionsmittel, Durchfluß aufgetragene Proteinmenge, Auftragsvolumen etc. sind den jeweiligen Legenden der Abbildungen zu entnehmen.

IV. Analytische und immunologische Methoden

1. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Kollagen wurde in 0.05 % essig-saurer Lösung durch Messung des optischen Drehwertes α bei 405 nm bestimmt. Der spezifische optische Drehwert von nativem Kollagen beträgt bei dieser Wellenlänge - 1040°. Die Kollagenkonzentration ergab sich nach:

$$c = \frac{\alpha \cdot 1000}{1040}$$

Alle anderen Proteinkonzentrationen wurden durch Messung der optischen Dichte bei 280 nm bestimmt, wobei für Fibrinogen und seine Derivate in physiologischen Puffern ein spezifischer Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 15.2$ (130) und für CIG $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 12.8$ (77) in der Berechnung zugrunde gelegt wurde.

2. Bestimmung der Gerinnbarkeit

Zur Bestimmung des gerinnbaren Anteils von Fibrinogenfraktionen wurde die von Hörmann und Gollwitzer (131) beschriebene Methode verwendet. Das nach Zugabe von Thrombin gebildete Gerinnsel wurde in alkalischer Harnstofflösung aufgelöst und die Extinktion bei 283 nm abzüglich eines Basiswertes bei 320 nm spektral-photometrisch gemessen. Parallel dazu wurde die Extinktionsdifferenz der Fibrinogen-Ausgangslösung bestimmt. Aus dem Verhältnis der Extinktionsdifferenzen von Fibrin und Fibrinogen errechnet sich die Gerinnbarkeit nach:

$$\text{Gerinnbarkeit (\%)} = \frac{E_{\text{Fibrin}}}{E_{\text{F'gen}}} \times 100$$

Die Gerinnbarkeit stellt ein Maß für die Reinheit von Fibrinogenlösungen dar. Sie erreicht jedoch bei einer 100 % reinen Fibrinogenlösung aufgrund der Abspaltung der Fibrinopeptide während des Gerinnungsvorganges nur einen Wert von 98 %.

Lösungen mit geringem gerinnbaren Anteil ergaben mit dieser Methode wahrscheinlich etwas überhöhte Werte, da vom entstehenden Gerinnsel unkontrolliert nicht gerinnbare Anteile (CIG) adsorbiert wurden.

3. SDS-Gelelektrophorese

Sie wurde nach der von Furthmayr und Timpl beschriebenen Methode (132) in Glaszylindern von 0.6 x 10 cm Größe durchgeführt.

Es wurden je nach angestrebtem Trennbereich 3.5, 5 und 7.5 %ige Gele (Acrylamid, Methylen-Bisacrylamid und SDS, Serva) verwendet. Der Kammerpuffer enthielt 0.1M Natriumphosphat, pH 7.0, und 0.2 % SDS. Die aufzutrennenden Proteinfractionen wurden gegen Auftragspuffer, der 0.01M Natriumphosphat, 5M Harnstoff und 0.2 % SDS, pH 7.0, enthielt, dialysiert oder darin gelöst. Bei Bedarf wurden die Proben 30 Minuten bei 56 °C unter Zugabe eines Überschusses von festem Dithioerythrit (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) reduziert. Pro Gel wurden zwischen 20 und 60 µg Protein aufgetragen und mit 6 mA / Gel der Elektrophorese unterworfen. Die Elektrophoresedauer variierte zwischen 8 und 12 Std. Anschließend wurden die Gele mit einer Lösung von 0.25 % Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg) in 20 %iger TCA 2 Stunden auf Protein angefärbt. Entfärbt wurde in 7 %iger Essigsäure.

Bei der Elektrophorese von ^{14}C -Putrescin-markiertem Material wurden jeweils 2 Proben elektrophoretisch aufgetrennt, wobei ein Gel auf Protein angefärbt, das andere mittels eines mechanischen Gelschneidegerätes in gefrorenem Zustand in 1 mm dicke Scheibchen geschnitten wurde. Jede Scheibe wurde in ein kleines Zählgefäß gebracht, mit 0.5 ml 30 %igem H_2O_2 versetzt und 5 - 7 Std. bei 70 - 80 °C verschlossen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit je 10 ml Scintillations-Flüssigkeit (Scinti-Gel, Roth, Karlsruhe) aufgefüllt und ihre Radioaktivität in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (Typ LS - 330, Beckman Instruments) bestimmt.

4. Aminosäureanalyse

Etwa 200 µg Protein wurden in 1 ml 6N HCl, die 0.05 % Merkaptoäthanol enthielt, unter Stickstoff für 24 Std. bei 110 °C hydrolysiert. Die Analysen wurden an einem automatischen Aminosäureanalysator (Typ D-500, Durrum, London) gefahren.

5. Geldiffusion

Antigen-Antikörper-Reaktionen wurden durch Geldiffusion nach der Methode von Ouchterlony (133) in einer Mikroversion in 1 %igem Agarosegel (Agarose Typ OREO, Behringwerke AG, Marburg) in Phosphatpuffer der Ionenstärke $I = 0.15$ und pH 7.4 verfolgt. Die Präzipitationslinien wurden mit einer Lösung von 0.6 % Amidoschwarz 10B in einem Gemisch von Methanol : Eisessig : Wasser = 45 : 10 : 45 (v/v) angefärbt und im selben Lösungsmittel entfärbt.

Mittels dieser Technik wurden die selbst gewonnenen Antiseren auf ihren Titer geprüft. Diejenigen Antiseren, die noch in der Verdünnung 1 : 32 eine sichtbare Präzipitationslinie mit dem Antigen ($c = 0.5 \text{ mg / ml}$) ergaben, wurden für die immunologischen Untersuchungen verwendet (Gelpräzipitations-Test, vgl. Abschnitt V.1).

6. Immunelektrophorese

Sie wurde nach den Angaben von Scheidegger (134) durchgeführt. Aufgetrennt wurde in 4 %igem Agarosegel (Agarose Typ OREO, Behringwerke AG, Marburg) in Natrium-Barbiturat-Acetat-Puffer der Ionenstärke $I = 0.1$ und pH 8.6. Gefärbt wurde wie bei der Geldiffusion.

V. Serologische Methoden

1. Darstellung von Antiseren

Antiserum gegen CIG wurde in Kaninchen erzeugt, indem 1 - 1.5 mg hochgereinigtes Protein in 2 ml 0.1M Tris, 0.1M NaCl, pH 7.4, vermischt mit 2 ml komplettem Freudschen Adjuvans (CFA), subcutan injiziert wurden. Nach 21 Tagen erfolgte eine Booster-Injektion subcutan mit der gleichen Mischung. Weitere 21 Tage nach dieser Injektion wurden die Tiere durch Herzpunktion entblutet. Die erhaltenen Antiseren wurden in der Geldiffusion (vgl. Abschnitt IV.5) und Immunelektrophorese (vgl. Abschnitt IV.6) gegen Plasma auf ihre Spezifität geprüft. Sie wiesen, bestimmt durch Gelpräzipitation, stets einen Titer $> 1 : 32$ auf. Aus verschiedenen Kaninchenseren wurde ein Pool gebildet und in kleinen Portionen eingefroren. Für den Protein-Bindungstest (vgl. Abschnitt VII.1) wurde das Antiserum ohne weitere Reinigung eingesetzt, für die angeführten Geldiffusionen und Immunelektrophoresen wurde monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum nach Immunsorption an immobilisiertem CIG verwendet.

Dazu wurde auf eine mit PBS äquilibrierte CIG-Sepharose-Säule (1.5 x 20 cm, Durchfluß 21 ml / Std.) 20 ml rohes Antiserum gebracht und nicht adsorbierbare Serumproteine durch Elution mit PBS von der Säule gespült. Anschließend erfolgte die erste Elution mit 30 ml 1M Essigsäure und 20 ml 0.05M HCl in 0.15M NaCl, wobei die proteinhaltigen Fraktionen gesammelt, mit 4M Tris neutralisiert, gegen PBS dialysiert und eingeengt wurden. Die erhaltene Antikörper-Fraktion erwies sich als weitgehend monospezifisch in der Geldiffusion gegen Gesamtplasma.

Nach der sauren Elution wurde die Säule wieder mit PBS durchströmt und eine zweite Elution mit 3M KSCN in PBS vorgenommen. Proteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt, gegen PBS dialysiert und eingeengt. Diese zweite, mengenmäßig kleinere Antikörper-Fraktion stellte den absolut mono-

spezifischen Antikörper gegen Human-CIG dar. Sie ergab in der Geldiffusion und in der Immunelektrophorese gegen Plasma nur eine Präzipitationslinie bzw. einen Präzipitationsbogen.

Zur Identifizierung von CIG als nicht-fibrinogenes Begleitprotein in den Anfängen dieser Arbeit wurde ein authentisches Anti-Human-CIG-Antiserum verwendet, das mir freundlicherweise von der Fa. Behringwerke AG, Marburg zur Verfügung gestellt wurde.

Antiserum gegen Anti-Gelatine-Faktor (AGF) aus Humanserum wurde aus einer Ziege gewonnen, die mit jeweils 6 x 150 µg AGF-Rohfraktion (Eluat von Serum, adsorbiert an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert) in 1 ml 0.1M Tris, 0.1M NaCl pH 7.4, vermischt mit 1 ml kompletten Freud-schen Adjuvans (CFA), in wöchentlichem Abstand immunisiert worden war. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde zusätzlich die 10fache Menge AGF zusammen mit 1 ml CFA subcutan verabreicht. Bei Bedarf, jedoch nicht früher als eine Woche nach dieser Injektion, wurde dem Tier bis zu 50 ml Blut abgenommen und zu Serum aufgearbeitet. Das Immunisierungsschema wurde nach Absinken des Titers wiederholt.

Die anderen monospezifischen Antiseren (Anti-Human-Fibrinogen, Anti-Human-Albumin) stammten aus Kaninchen und wurden von der Fa. Behringwerke AG, Marburg bezogen. Sie waren in Geldiffusion und Immunelektrophorese gegen Plasma auf ihre Monospezifität geprüft worden.

2. Passive Hämagglutination

Fibrinogen, CIG sowie Kollagen Typ I- und III nativ und Typ I-denaturiert wurden nach der von Beil et al. (135) beschriebenen Glutaraldehyd-Technik an Human-Erythrocyten der Blutgruppe O Rhesus positiv gekoppelt. Der Endpunkt der Agglutination wurde durch direkte Titration bestimmt. Die mit 0.1 % BSA in PBS verdünnten Antiseren bzw. Proteinlösungen

wurden mit 50 μ l einer 0.5 %igen Suspension von proteinbeladenen Erythrocyten auf Mikrotiterplatten (Cooke Engineering) bei 4 °C inkubiert. Die Agglutination wurde 12 Std. später abgelesen. Weitere Angaben sind den jeweiligen Legendenden der Tabellen zu entnehmen.

VI. Spaltungsreaktionen

1. Reduktive Spaltungen

1.1 Vollständige Reduktion

Sie erfolgte in Anlehnung an die von Gollwitzer et al. (136) beschriebene Methode.

100 mg Protein wurden in 20 ml 0.1M Tris-HCl, pH 8.0, in 8M Harnstoff gelöst und die Lösung vorsichtig 5 Minuten lang mit Stickstoff durchströmt. Nach Zugabe von 62 mg festen DTE (Endkonzentration 0.02M) unter Stickstoff wurde der pH-Wert nachgestellt, und das Reaktionsgemisch 4 Std. bei 37 °C inkubiert. Die vollständige Reduktion wurde auf Fibrinogen, Albumin und CIG angewandt.

1.2 Partielle Reduktion in Gegenwart von Harnstoff

Diese Spaltungsmethode wurde selbst erarbeitet und ist im Kapitel "ERGEBNISSE" ausführlich beschrieben (vgl. Abschnitt II.1). Albumin und Fibrinogen wurden so behandelt.

1.3 Partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff

Diese Spaltung für besonders labile Disulfid-Bindungen wurde in Anlehnung an die Methode von Laurell und Thulin (137) durchgeführt.

Es wurden 10 mg Protein in 5 ml 0.1M Tris-HCl, pH 8.0, gelöst und unter Rühren in Stickstoff-Atmosphäre 15 mg festes DTE (Endkonzentration 0.02M) zugesetzt. Die Reduktionszeit

betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur. Diese reduktive Spaltung diente zur Charakterisierung kovalenter Fibrinogen-Albumin-Assoziate.

1.4 Carboximethylierung

Sie entsprach den Angaben von Gollwitzer et al. (136). Die Überführung der bei der Reduktion freigesetzten Thiolgruppen in ihre Carboximethyl-Derivate, geschah, je nach Art der vorhergegangenen Reduktion, entweder in Gegenwart oder in Abwesenheit von 8M Harnstoff. Im Falle der partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff wurde sie, wie im Kapitel "ERGEBNISSE" (vgl. Abschnitt II.1.1) angegeben, auf einer Sephadex G-25-Säule durchgeführt.

Normalerweise wurde dem Reaktionsgemisch nach der vorgesehenen Reduktionszeit pro ml 17 mg festes Jodessigsäure-Natriumsalz (Endkonzentration 0.08M) zugefügt und der pH-Wert mit konz. NaOH auf 8.5 gebracht und konstant gehalten. Nach einstündiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde das Material an einer Sephadex G-25-Säule entsalzt und dabei in Startpuffer zur CM-Chromatographie überführt.

1.5 Aminoäthylierung

Im Anschluß an die partielle Reduktion in Gegenwart von Harnstoff wurde das partiell gespaltene und carboximethylierte Material einer vollständigen Spaltung unterworfen. Die dabei zusätzlich freigesetzten Thiolgruppen wurden nach der Methode von Gollwitzer et al. (138) aminoäthylisiert.

Dazu wurde 100 mg nachgespaltenes Protein, das sich in 20 ml 8M Harnstoff, 0.1M Tris-HCl, pH 8.6 befand (der pH-Wert wurde durch Zugabe von festem Tris eingestellt) mit 0.2 ml (172 mg - Endkonzentration von 0.2M) Äthylenimin (Pierce Chemical Comp., Rockford) unter Stickstoff-Atmosphäre versetzt. Der pH-Wert, der rasch ins Basische ansteigt, wurde ständig mit konz. HCl auf 8.6 nachgestellt. Die Reaktion war

etwa nach 15 Minuten beendet, nach weiteren 15 Minuten Rühren unter N_2 -Atmosphäre wurde an Sephadex G-25 entsalzt.

2. Fragmentierungsreaktionen

2.1 Plasminolyse

Für den Plasminabbau von CIG wurden zu 10 ml einer Lösung des Proteins der Konzentration 1 - 1.5 mg / ml in 0.1M Tris, 0.1M NaCl, pH 7.4, 12 Einheiten Plasminogen (Forschungsplasminogen Kabi, Stockholm), gelöst in 1 ml Puffer, zugegeben und mit 500 Einheiten Streptokinase (Teststreptokinase, Behringwerke AG, Marburg) in 0.1 ml Puffer aktiviert. Der Abbau wurde bei 37 °C, je nach Art des Experiments, unterschiedlich lange durchgeführt und am Ende durch Zugabe von festem Harnstoff bis zu einer Endkonzentration von 8M gestoppt.

^{14}C -Putrescin-markiertes CIG ("ERGEBNISSE", vgl. Abschnitt V.1) wurde unter denselben Bedingungen plasminolytisch. Das radioaktive Material war vor der Proteolyse zur Entfernung von Fremdproteinen (F XIII, Thrombin, Albumin) in dem zu seiner Endreinigung verwendeten Stufengradienten ("ERGEBNISSE", vgl. Abschnitt IV.2) chromatographiert worden.

Fibrinogen wurde unter den von Marder et al. (39) beschriebenen Reaktionsbedingungen mit Plasmin abgebaut. Die Isolation der Fibrinogenspaltprodukte erfolgte durch Chromatographie des Reaktionsgemisches an Biogel A-5m, die Rechromatographie der Fraktionen an DEAE-Cellulose wurde entsprechend den dortigen Angaben durchgeführt.

2.2 Bromcyan-Abbau

Die Spaltung mit Bromcyan wurde nach der von Timpl et al. (139) beschriebenen Methode durchgeführt.

50 mg lyophilisiertes, salzfreies CIG wurde in 10 ml 70 %iger Ameisensäure (v/v) gelöst. Durch die Lösung wurde

ein leichter N_2 -Strom geleitet, danach 320 mg festes Bromcyan zugegeben, erneut Stickstoff eingeleitet und unter Luftausschluß 4 Stunden bei 30 - 35 °C inkubiert. Am Ende der Reaktionszeit wurde mit 4 Teilen Wasser verdünnt und die Mischung lyophilisiert.

^{14}C -Putrescin-markiertes CIG wurde unter denselben Bedingungen abgebaut. Das markierte Protein war jedoch vorher an DEAE-Cellulose rechromatographiert worden (vgl. Abschnitt 2.1).

^{14}C -Putrescin-markierte, reduziert-carboximethylierte CIG-Untereinheiten wurden ebenfalls wie oben beschrieben mit Bromcyan abgebaut. Verwendet wurde dafür ein Material, das an DEAE-Cellulose rechromatographiert, in Gegenwart von 8M Harnstoff vollständig gespalten und carboximethyliert (vgl. Abschnitt VI.1.1 und 4 dieses Kapitels) und an CM-Cellulose chromatographiert worden war ("ERGEBNISSE", vgl. Abschnitt IV.3.1).

VII. Protein-Bindungssysteme

1. Radio-immunologischer Protein-Bindungstest

Fibrinogen, Fibrinmonomer und verschiedene Kollagentypen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, mit CIG bzw. AGF Assoziate zu bilden. Dazu wurden die mit ^{125}J -markierten Proteine mit CIG bzw. AGF inkubiert, und die gebildeten Komplexe mit einem gegen letztere Komponenten gerichteten Antiserum ausgefällt.

Es wurden jeweils 100 μl CIG- bzw. AFG-Lösung als Verdünnungsreihe vorgegeben (höchster Wert: 50 μg in 100 μl 0.1M Tris, 0.1M NaCl, pH 7.4; Verdünnung mit 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 0.5 % BSA, 0.04 % Tween 20 (Serva, Heidelberg), pH 7.4), jeweils mit 200 μl Tris / NaCl / BSA / Tween 20, pH 7.4, verdünnt und mit jeweils 100 ng des markierten Proteins in 100 μl

(konstant) in der Kälte 20 Stunden inkubiert. Unter Einhaltung dieser Mengenverhältnisse liegt ein etwa 100fach molarer Überschuß von CIG bzw. AGF gegenüber dem markierten Protein vor. Die Fällung der gebildeten Assoziate erfolgte durch Zugabe von 200 µl eines Anti-Human-CIG- bzw. AGF-Antiserums. Nach weiteren 20 Stunden wurden die gebildeten Präzipitate bei 3000 g in einer Kühlzentrifuge (Typ Mistral 2L, Measuring and Scientific Equipment, London) bei 4 °C abzentrifugiert, 3 x mit 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 0.08 % Tween 20, pH 7.4, gewaschen und die präzipitierte Radioaktivität im γ-Zähler (Typ Gamma 300, Beckman Instruments) bestimmt. Zur Kontrolle wurde für jedes Experiment eine Doppelprobe mitgeführt, die kein CIG bzw. AGF enthielt, jedoch die entsprechende Menge Puffer. Die erhaltenen Daten errechneten sich zu:

$$\text{gebundenes Protein (ng)} = \frac{\text{cpm(Ppt)} - \text{cpm(Kontrolle)}}{\text{cpm(zugegeben)}}$$

1.1 Markierung von Proteinen mit ¹²⁵Jod

Fibrinogen, CIG und Kollagen wurden nach der von Adelmann et al. (140) beschriebenen Methode mit ¹²⁵Jod radioaktiv markiert. Es wurden 2 ml Proteinlösung der Konzentration 1.5 mg / ml in 0.5M NaCl, 0.05M PO₄, pH 7.4, nach Zugabe von 1 mCi trägerfreiem ¹²⁵Jod (NEN-Chemicals, Dreieich) in 200 µl NaCl / PO₄ und 150 µg Chloramin T (Merck AG, Darmstadt) in 750 µl NaCl / PO₄ für 10 Minuten stehengelassen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 160 µg Natriummetabisulfit in 800 µl NaCl / PO₄ gestoppt. Nach 24stündiger Dialyse gegen laufendes Leitungswasser wurde mit 3fachem Wechsel gegen 0.1M Tris, 0.1M NaCl, pH 7.4, dialysiert.

1.2 Bestimmung von Protein-gebundenem ^{125}Jod

Für jeden Protein-Bindungstest wurde die Menge an proteingebundener ^{125}J -Radioaktivität mittels TCA- und Immunpräzipitation bestimmt. Zu 100 μl der Lösung des markierten Proteins (etwa 300 ng) wurden 100 μl 10 %iges Normal-Kaninchenserum in PBS und 0.2 ml 1 %iges BSA in PBS gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ wurden entweder 400 μl 20 %ige TCA (TCA-Präzipitation) oder 200 μl Anti-Protein-Antiserum und 12 Stunden später 500 μl Anti-Immunglobulin-Antiserum vom Kaninchen (Immunpräzipitation) hinzugefügt. Die gebildeten Präzipitate wurden bei 3000 g abzentrifugiert und entweder mit 10 %iger TCA oder mit Waschpuffer des Protein-Bindungstestes 3 x gewaschen. Die Radioaktivität der Präzipitate wurde gemessen und in Relation zur eingesetzten Radioaktivität gesetzt. Nur bei Werten, die zwischen 85 und 95 % lagen, wurden die markierten Proteine im Bindungstest eingesetzt. Die gebundene Radioaktivität betrug bei allen Proteinen etwa 25 - 30000 cpm / 100 ng.

2. Protein-Sepharose-Beladungstest

Damit wurde der Beladungsgrad verschiedener Protein-Sepharosen durch ^{125}J -markierte Proteine festgestellt. Dieser Test ist als Parallelexperiment zur Affinitätschromatographie zu sehen, wurde jedoch wie der Protein-Bindungstest in Plastikröhrchen durchgeführt.

Es wurden je Glas 500 μl der jeweiligen Protein-Sepharose-Suspension (etwa 10 %ig in PBS) zweimal mit je einem Milliliter 0.1M NaCl, 0.1M Tris, 0.5 % BSA, 0.04 % Tween 20, pH 7.4, das 5 mMol CaCl_2 enthielt, gewaschen und in 500 μl desselben Puffers suspendiert. Je Probe wurden 100 ng des jeweiligen ^{125}J -Proteins in 100 μl des Puffers zugegeben, geschüttelt und für 4 Stunden in der Kälte inkubiert, wobei die Proben gelegentlich geschwenkt wurden. Danach wurde je zweimal mit einem Milliliter des obigen Puffers gewaschen, die adsorbierte Radioaktivität im γ -Zähler (Modell Gamma, Beckman Instruments) bestimmt und in Relation zur gesamten angebotenen

Radioaktivität gesetzt. Für jedes ^{125}J -Protein wurde je eine Doppelprobe mit unbehandelter Sepharose (K_1) und eine nur mit Puffer ohne Sepharose (K_0) zur Kontrolle mitgeführt. Die in den Tabellen aufgeführten Werte sind Absolutwerte ohne Abzug der Kontrollen, K_1 und K_0 sind stets miterfaßt.

VIII. Biologische Testsysteme

1. Makrophagen-Armierungstest

Damit wurde die Beladbarkeit von CIG- bzw. AGF-armierten peritonealen Exudatzellen mit ^{125}J -Kollagen Typ I-denaturiert bestimmt.

Meerschweinchen wurden intraperitoneal je 20 ml Paraffinöl (Paraffinum liquidum, DAB 7, Merck AG, Darmstadt) gespritzt und die gebildeten peritonealen Exudatzellen 3 - 5 Tage später aus der Bauchhöhle geerntet. Nach 3maligem Waschen mit BSS⁺ wurden jeweils 2×10^7 Zellen / ml darin suspendiert und mit 200 µl einer 0.1 %igen Trypsinlösung (TL 7 IR, Worthington), das sind 100 µg / 10^7 Zellen, 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit BSS gewaschen und zu 10^7 Zellen / ml suspendiert. Zu jeweils 500 µl der Zellsuspension wurde CIG bzw. AGF als Verdünnungsreihe (höchster Wert 150 µg in 200 µl BSS) zugegeben und 60 Min.

⁺BSS: Balanced Salt Solution

Stocklösung I: 10 g Glucose, 0.6 g KH_2PO_4 , 1.84 g Na_2HPO_4 , 0.1 g Phenolrot, in etwa 2 Liter H_2O bidest. gelöst.

Stocklösung II: 1.86 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g KCl , 80 g NaCl , 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, in etwa 2 Liter H_2O bidest. gelöst.

Stocklösung I und II wurden gemischt und auf 10 Liter mit H_2O bidest. aufgefüllt.

bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugieren und einmaligem Waschen mit 1 ml BSS wurde je Probe 200 μ l BSS und 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I in 100 μ l BSS zugefügt und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit BSS wurde das zellgebundene ^{125}J -Kollagen im γ -Zähler (Typ Gamma 300, Beckman Instruments) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Dreifach-Bestimmungen.

2. Fibroblasten-Anheftungstest

In diesem System wurde der Haftvorgang von Fibroblasten auf einer Fibrinmatrix und die damit verbundene Formänderung der Zellen studiert. Auf eine längere Kultur bis zur Konfluenz wurde verzichtet.

Die Versuche wurden in Plastik-Petrischalen (35 x 10 mm, Falcon) durchgeführt, die mit feinem Fibringel ausgekleidet waren. Dazu wurden pro Petrischale 800 μ l einer 0.1 %igen Fibrinogen-Lösung in 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 7.4, mit 1.5 NIH-Einheiten Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke AG, Marburg) in 80 μ l Tris / NaCl, pH 7.4, zur Gerinnung gebracht und 3 Std. bei 38 °C im Brutschrank inkubiert. Ein Teil der Gele wurde zu Beginn des Experimentes frisch vorbereitet, ein Teil war bereits 15 Std. im Brutschrank steril "gealtert" worden.

Die verwendeten Zellen waren Human-Fibroblasten aus embryonaler Haut in der 6. - 10. Passage und waren mir freundlicherweise von Dr. Th. Krieg aus unserer Abteilung zur Verfügung gestellt worden. Sie waren in Dulbecco's Medium, das 10 Einheiten / ml Penicillin / Streptomycin, 10 μ g / ml Ascorbinsäure, 2 mM Glutamin und 10 % fötales Kälberserum (FKS, Seromed, München) enthielt, kultiviert worden.

Für das Experiment wurden 4×10^6 Zellen im konfluenten Zustand mit 5 ml 0.32 %iger Trypsinlösung (Worthington)

für 10 Minuten behandelt. Anschließend wurden sie in ergänztes Dulbecco-Medium gebracht, das anstatt 10 % FKS 3 mg / ml BSA enthielt, darin 3 x gewaschen und in 20 ml dieses BSA-haltigen Mediums zu etwa 2×10^5 Zellen suspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 900 μ l, das sind 1.8×10^5 Zellen, auf die mit Fibringel ausgekleideten Petrischalen ausgesät und gleich danach verschiedene Proteine (CIG, F XIII_a und beides) zugesetzt. Die detaillierte Versuchsanordnung sowie die Auswertung des Experimentes nach 3 und 15 Std. Kultur bei 38 °C / 5 % CO₂ ist im Kapitel "ERGEBNISSE" (vgl. Abschnitt VII.3) angegeben.

D. ERGEBNISSE

I. Methodische Entwicklungen zur chromatographischen Fraktionierung von Plasmafibrinogen

Das in der Blutbahn kreisende fibrinogene Material besteht, wie eingangs erwähnt, aus intaktem Normalfibrinogen und einer Reihe partiell abgebauter Fibrinogenderivate. Seine Auftrennung geschieht aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit durch fraktionierte Fällung.

Zur Fraktionierung von Fibrinogen auf chromatographischem Wege war zu Beginn dieser Arbeit nur wenig bekannt. So berichteten Finlayson und Mosesson (141) sowie Mosher und Blout (142) über die Chromatographie von Rohfibrinogen an DEAE-Cellulose in einem linearen NaCl-Gradienten, wobei ein komplexes Elutionsprofil erhalten wurde. Im Eluat traten jedoch an jeder Stelle des Gradienten mittels SDS-Gelelektrophorese nicht zu unterscheidende Fraktionen auf. Nach DTE-Reduktion wurden stets Banden der Mobilität aller drei Fibrinogen-Untereinheiten festgestellt, ohne Hinweis auf Verkürzung der einen oder anderen Peptidkette ("EINFÜHRUNG" vgl. Abschnitt II.1.3).

In diesem Abschnitt wird erstmals über ein chromatographisches Trennsystem berichtet, mit dem Rohfibrinogen in definierte Einzelfractionen aufgetrennt werden kann. Desweiteren wird das chromatographische Verhalten von Plasmafibrinogen an immobilisiertem Fibrinmonomer untersucht. Schließlich wird die Isolierung von fibrinogenem Material aus einer schwach Fibrinogen-haltigen Plasmafraction unter Einsatz einer Kombination von Affinitätschromatographie und Ionenaustauschchromatographie vorgestellt.

1. Chromatographische Auftrennung von Rohfibrinogen
(Fraktion I-O) an DEAE-Cellulose

Durch Fällung von Plasma mit Glycin bei 4 °C bis zu einer Endkonzentration von 2.1M wird Fraktion I-O als Niederschlag erhalten. Im Präzipitat findet sich neben Normalfibrinogen ein Großteil der leichterlöslichen Fibrinogenderivate, neben geringen nicht fibrinogenen Anteilen. Das Material, das normalerweise mit der Methode der fraktionierten Fällung weiter aufgearbeitet wird, soll hier auf chromatographischem Wege fraktioniert werden.

Das zur Auftrennung an DEAE-Cellulose verwendete Gradientensystem bestand aus einem in sieben Pufferstufen unterteilten Tris-Phosphat-Gradienten. Die einzelnen Stufen unterschieden sich außer in der Ionenstärke auch im pH-Wert. Sie wurden durch Mischen von Startpuffer p_1 (0.039M Tris- PO_4 , pH 8.6) und Limitpuffer p_7 (0.5M Tris- PO_4 , pH 4.2) erhalten. In Tab. 2 sind Angaben über Molarität und pH, sowie die Anteile von Start- und Limitpuffer in den einzelnen Pufferstufen zusammengefaßt. Im oberen Teil von Abb. 7 ist das Elutionsprofil der Chromatographie von Fraktion I-O aus Plasma dargestellt, der untere Teil zeigt die elektrophoretischen Trennbilder, nachdem die mit den verschiedenen Pufferstufen erhaltenen Fraktionen der SDS-Gelelektrophorese unterworfen worden waren.

Pufferstufe	Mischung aus			pH
	0.039M Tris-PO ₄	+ 0.5M Tris-PO ₄	Tris	
	pH 8.6 (Volumina)	pH 4.2 (Volumina)	(M/l)	
p ₁	49.5	-. -	0.039	8.6
p ₂	48.0	1.5	0.053	7.8
p ₃	47.0	2.5	0.062	7.4
p ₄	45.0	4.5	0.081	7.0
p ₅	40.0	9.5	0.127	6.2
p ₆	30.0	19.5	0.220	5.3
p ₇	49.5	-. -	0.500	4.2

Tabelle 2 Zusammensetzung des abgestuften Gradienten zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma-fibrinogen an DEAE-Cellulose.

Der Anfangsbereich des Stufengradienten, in dem insbesondere Fibrinogen und seine leichterlöslichen Derivate erscheinen sollten, wurde stark gespreizt. Die zweite Hälfte des Gradienten wurde relativ steil angelegt. Um Artefakten bei der Fraktionierung vorzubeugen, war die Säule mit 0.02 % Prote-
 aseninhibitor (Trasylol, Bayer AG, Leverkusen) äquilibriert worden. Die zur Elution verwendeten Pufferstufen enthielten jeweils die entsprechende Menge Trasylol.

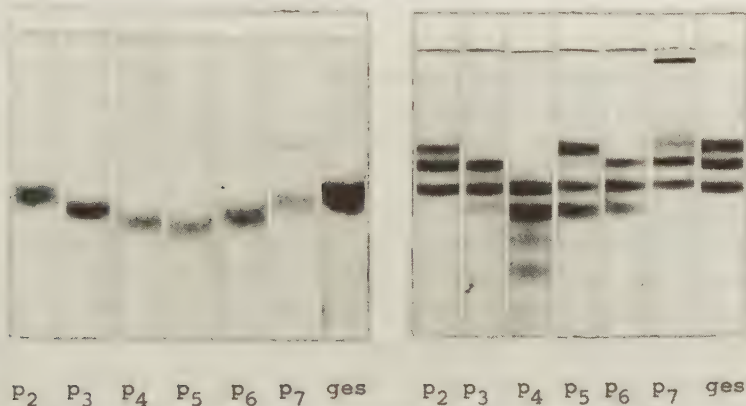
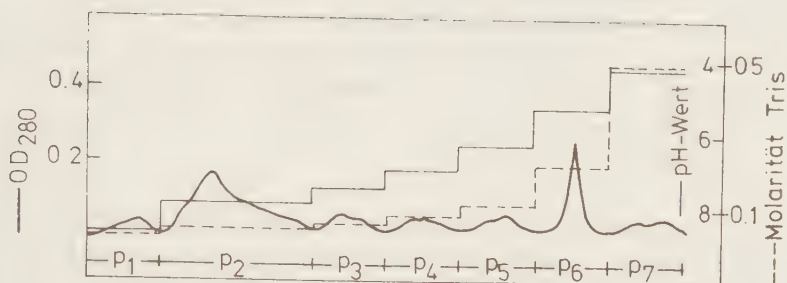


Abb. 7 Auftrennung von Fraktion I-O aus Plasma an DEAE-Cellulose

oben: Elutionsprofil, Verlauf von Ionenstärke und pH-Wert
 Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 13.2 ml / Std.; aufgetragen:
 30 mg Protein in 6 ml 0.039M Tris-PO₄, pH 8.6; Elution: sieben-
 stufig (vgl. dazu Tab. 2). Der Wechsel zur nächsten Puffer-
 stufe erfolgte jeweils nach Erreichen einer klaren Grundlinie.
 unten: SDS-Gelelektrophorese der mit verschiedenen Puffer-
 stufen erhaltenen Fraktionen
 links: nicht reduzierte Proben; 3.5 %ige Gele, 8 Std.
 rechts: DTE-reduzierte Proben; 7.5 %ige Gele, 12 Std.
 Die mit Startpuffer p₁ erscheinende Fraktion mit nicht adsor-
 bierten, fibrinogenfremden Proteinen wurde nicht berücksichtigt.

Es wurde deutlich, daß die erste mit p_2 eluierbare fibrinogenhaltige Fraktion als lange schleppender Gipfel aus der Säule trat, so daß ihre vollständige Elution vergleichsweise lange andauerte (Abb. 7, oberer Teil). Die übrigen Fraktionen erschienen nach dem Pufferwechsel als schmale Elutionsgipfel.

Die SDS-Gelelektrophorese der nicht reduzierten Fraktionen (Abb. 7, unten links) ergab für p_2 bis p_7 jeweils eine Bande im Bereich der elektrophoretischen Beweglichkeit von Fibrinogen, wobei das Material bei den verschiedenen Fraktionen geringfügig unterschiedlich weit ins Gel eingedrungen war. So nahm die Mobilität der eluierten fibrinogenen Komponenten bis zur Pufferstufe p_4 / p_5 gegenüber p_2 kontinuierlich zu, was einer Abnahme der entsprechenden Molekulargewichte gleichkommt. Dann verringerte sich die elektrophoretische Beweglichkeit wieder bis zu Pufferstufe p_7 , wo sie einen der Fraktion p_2 vergleichbaren Wert erreichte.

Nach DTE-Reduktion (Abb. 7, unten rechts) wurde für die mit Pufferstufe p_2 erhaltene Fraktion ein Bandenmuster gefunden, das mit seinen drei Untereinheiten $A\alpha$, $B\beta$ und γ dem von Normalfibrinogen entspricht. Dieser Fraktion kam auch im nicht reduzierten Zustand das höchste Molekulargewicht zu, abgesehen von einer nicht-fibrinogenen Begleitkomponente in Fraktion p_7 (vgl. Abschnitt I.4). Für die mit Pufferstufe p_3 bis p_6 eluierten Fraktionen wurden Bandenmuster gefunden, wie sie für partiell abgebaute Fibrinogenderivate charakteristisch sind. Offensichtlich war der Abbau in den mit p_4 / p_5 erhaltenen Fraktionen am weitesten fortgeschritten. Im elektrophoretischen Trennbild von Fraktion p_5 sei auf eine Bande im Bereich der intakten Fibrinogen- α -Kette hingewiesen, die wahrscheinlich von Albumin herrührt. Dieses Begleitprotein (Molekulargewicht 6.5×10^4), das eng vergesellschaftet mit bestimmten Fibrinogenderivaten auftreten kann (vgl. Abschnitt II.2), erscheint aufgrund seines niedrigen Molekulargewichts nicht mehr im Bandenmuster der entsprechenden nicht reduzierten Fraktion.

Pufferstufe	Anteil am fällb. Gesamtfibrinogen	Kettenzusammensetzung	Bemerkungen
P ₁	15 %	—	nicht fibrinogene Proteine
P ₂	39 %	α , β und γ intakt	Normalfibrinogen
P ₃	10 %	verkürzte α ; β und γ intakt	partiell abgebautes F' gen
P ₄	6 %	verkürzte α und β ; γ intakt	X-Fragment
P ₅	8 %	verkürzte α und β ; γ intakt	X-Fragment
P ₆	11 %	verkürzte α ; β und γ intakt	partiell abgebautes F' in
P ₇	11 %	α , β und γ intakt	F' in, enthält CIG

Tabelle 3 Auswertung von Elutionsprofil und SDS-Gelelektrophorese aus der Auftrennung von Fraktion I-O aus Plasma an DEAE-Cellulose

Die Prozentangaben wurden durch Planimetrieren der Peakflächen berechnet. Fraktion P₆ und P₇ enthalten Fibrinogenderivate, die wahrscheinlich aus Assoziaten mit CIG herrühren.

Die mit Pufferstufe p_7 eluierte Fraktion ergab wieder das charakteristische Bandenmuster von Normalfibrinogen, sowie eine Bande im hochmolekularen Bereich, die dem in Abschnitt I.4 identifizierten "Kälte-unlöslichen Globulin (CIG) zukommt.

Anhand dieses abgestuften Trennsystems wurden somit erstmals aus Rohfibrinogen auf chromatographischem Wege in sich unterschiedliche Fibrinogenfraktionen isoliert. Tab. 3 gibt die halbquantitative Auswertung der Trennung und die qualitative Analyse der nach DTE-Reduktion erhaltenen Bandenmuster an. Demnach enthielt das gesamte, mit 2.1M Glycin aus Plasma bei 4 °C fällbare Material neben etwa 40 % intaktem Normalfibrinogen etwa 20 % partiell abgebaute Fibrinogenderivate, aber auch etwa 15 % Anteile, die zusammen mit der höhermolekularen Komponenten in späteren Fraktionen eluiert werden. Diese Werte entsprechen der von Lipinska et al. (25) aus SDS-Elektrophoresen abgeschätzten Größenordnung. Sie liegen jedoch weit über den Ausbeuten, wie sie für Normalfibrinogen und für partiell abgebaute Fibrinogene auf dem klassischen Wege der fraktionierten Äthanol-Glycin-Fällung (29) erhalten werden.

2. Affinitätschromatographie von Fraktion I-O an immobilisiertem Fibrinmonomer

Neben der Fraktionierung an DEAE-Cellulose wurde das chromatographische Verhalten von Rohfibrinogen Fraktion I-O an immobilisiertem Fibrinmonomer untersucht. Da sich die verschiedenen Fibrinogenspezies möglicherweise in ihrer Affinität zu Fibrinmonomer unterscheiden, wurde diese Methode auf ihre Eignung zur Isolierung einzelner Fibrinogenfraktionen aus einem heterogenen Gemisch überprüft.

Dazu wurde die mit 2.1M Glycin aus Plasma bei 4 °C ausfällbare Fraktion I-O nach zweimaligem Waschen mit gesättigter NaCl-Lösung bei 4 °C in Auftragspuffer gelöst und auf die in Auftragspuffer aequilibrierte Säule bei 4 °C aufge-

bracht (nicht adsorbiertes Material = Fraktion A). Die Desorption erfolgte zweistufig ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt III.1). Zunächst wurden mit 0.1M NaCl, pH 7.6, bei 37 °C die weniger stark adsorbierten Anteile (Fraktion B) eluiert, anschließend mit 1M KBr bei 4 °C das Material mit der stärkeren Affinität zu Fibrinmonomer (Fraktion C) gewonnen. Beide Fraktionen wurden jeweils in zwei Teilen gesammelt und mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Im oberen Teil von Abb. 8 ist das Elutionsprofil der Affinitätschromatographie dargestellt, der untere Teil zeigt die elektrophoretischen Trennbilder der verschiedenen Fraktionen.

Alle an Fibrinmonomer adsorbierbaren Fraktionen zeigten nach SDS-Gelelektrophorese im nicht reduzierten Zustand (Abb. 8, unten links) eine Bande im Bereich der Mobilität von fibrinogenem Material. Die beiden B-Fraktionen wiesen dabei gegenüber den beiden C-Fraktionen eine geringfügig größere Beweglichkeit, d.h. ein etwas kleineres Molekulargewicht auf. Nach Reduktion (Abb. 8, unten rechts) ergaben die beiden B-Fraktionen Bandenmuster, in denen die Bande im Bereich der intakten Fibrinogen-A α -Kette fehlte. Fraktion BI enthielt sogar noch über die Länge der α -Ketten hinaus abgebaute Kettenbruchstücke. In der mit 1M KBr desorbierten Fraktion C, besonders in CII, wurde jedoch die komplette, für intaktes Normalfibrinogen charakteristische Kettenzusammensetzung gefunden. Das bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose mit Pufferstufe p₇ eluierbare hochmolekulare Protein (vgl. Abschnitt I.1) erschien bei der Affinitätschromatographie an Fibrinmonomer in der BII-Fraktion, zusammen mit einem partiell abgebauten Fibrinogenderivat. Auf die Affinität dieser nicht-fibrinogenen Komponente zu Fibrinmonomer sei hingewiesen. Die Zusammensetzung der CI-Fraktion dieses Experimentes wird in Abschnitt II.2 weiter untersucht und mit einem neuartigen Aspekt verknüpft.

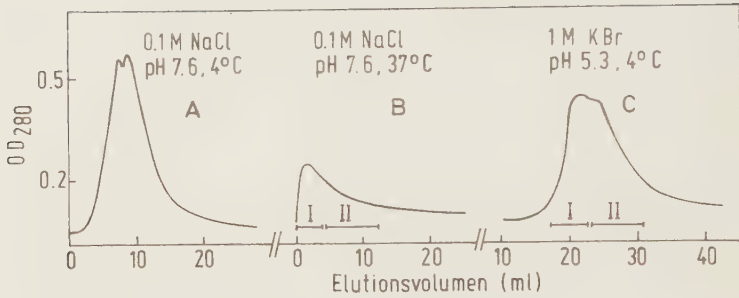


Abb. 8 Affinitätschromatographie von Fraktion I-O aus Plasma an immobilisiertem Fibrinmonomer

oben: Elutionsprofil. Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 18.5 ml / Std.; aufgetragen: 15 mg Protein in 3 ml 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, 4 °C; Desorption: Zweistufig, zunächst mit 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 37 °C, dann mit 0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C.

unten: SDS-Gelelektrophorese der adsorbierbaren Anteile. links: nicht reduzierte Proben; 3.5 %ige Gele, 8 Std. rechts: DTE-reduzierte Proben; 7.5 %ige Gele, 12 Std. Die mit 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6 bei 4 °C erscheinende Fraktion (A) wurde nicht berücksichtigt.

Tab. 4 stellt eine Beziehung zwischen der Gerinnbarkeit und der Kettenzusammensetzung der bei der Affinitätschromatographie von Rohfibrinogen Fraktion I-O an immobilisiertem Fibrinmonomer auf. Demnach stieg der Anteil an gerinnbarem Material von BI nach CII kontinuierlich an. Hand in Hand mit der entsprechenden Kettenzusammensetzung ergab sich für die partiell abgebauten Fibrinogenderivate eine deutlich verringerte Gerinnbarkeit gegenüber Normalfibrinogen.

Dieses Experiment zeigte erstmals, daß partiell abgebaute Fibrinogene an immobilisiertem Fibrinmonomer lediglich in der Kälte adsorbiert werden. Ihre Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial ist etwas schwächer als die von Normalfibrinogen, das die Wärmeelution der Säule übersteht und erst mit Bromid-haltigem Puffer desorbiert wird. Mit dem vorge-schalteten Wärmeschritt lassen sich beide Spezies grob von-einander trennen.

Fraktion	Gerinnbarkeit (%)	Kettenzusammensetzung
B I	48	verkürzte α und β , γ intakt
B II	63	verkürzte α ; β und γ intakt
C I	85	(zu wenig) α ; β und γ intakt
C II	91	α , β und γ intakt
Gesamt	76	α , β und γ

Tabelle 4 Gerinnbarkeit und Kettenzusammensetzung von Fraktionen, erhalten aus der Affinitätschromatographie von Fraktion I-O aus Plasma an immobilisiertem Fibrinmonomer

Fraktion BII enthält "Kälte-unlösliches Globulin (CIG)";
Bezüglich der Zusammensetzung von Fraktion CI vgl. Abschnitt II.2. Bestimmung der Gerinnbarkeit im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt IV.2)

3. Chromatographische Aufarbeitung eines an Fibrinogen
angereicherten Plasmaüberstandes auf Restfibrinogen

Die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer eignet sich zur Isolierung von Plasmafibrinogen (129,143). Mit der in Abschnitt I.2 vorgestellten zweistufigen Desorption ist eine grobe Fraktionierung der heterogenen Bestandteile möglich. In Kombination mit dem in Abschnitt I.1 beschriebenen DEAE-Trennsystem besteht nun die Möglichkeit, diese nicht einheitlichen Fibrinogenfraktionen in ihre Einzelkomponenten aufzutrennen.

An dieser Stelle wird nun der Überstand, der nach Präzipitation der Hauptmenge Fibrinogen aus Plasma durch 2.1M Glycin bei 4 °C (= Überstand von Fraktion I-O) hinterbleibt, unter Einsatz von Affinitätschromatographie und Fraktionierung an DEAE-Cellulose auf Restfibrinogen aufgearbeitet. Untersuchungen von Mosesson und Sherry (29) und Jilg et al. (32) enthält dieser Überstand bis zu 10 % der gesamten Plasmafibrinogen-Fraktion.

Der 2.1M Glycin enthaltende Plasmaüberstand wurde mehrfach gegen Auftragspuffer zur Affinitätschromatographie (0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6) dialysiert und auf das ursprüngliche Plasmavolumen eingeengt. Anschließend wurde das Material an immobilisiertem Fibrinmonomer bei 4 °C chromatographiert und zweistufig desorbiert (chromatographische Bedingungen siehe Legende von Abb. 8; aufgetragen 3 ml dialysierter Plasmaüberstand). Sowohl Fraktion B (erhalten mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 37 °C) als auch Fraktion C (0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C) wurden im abgestuften Gradienten an DEAE-Cellulose weiter aufgetrennt und die Einzelfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Abb. 9 zeigt die elektrophoretischen Trennbilder der mit den verschiedenen Pufferstufen erhaltenen Unterfraktionen von Fraktion C des Plasmaüberstandes. Eine halbquantitative Auswertung des DEAE-Chromatogramms ist in Tab. 5 am Ende dieses Abschnittes zu finden.

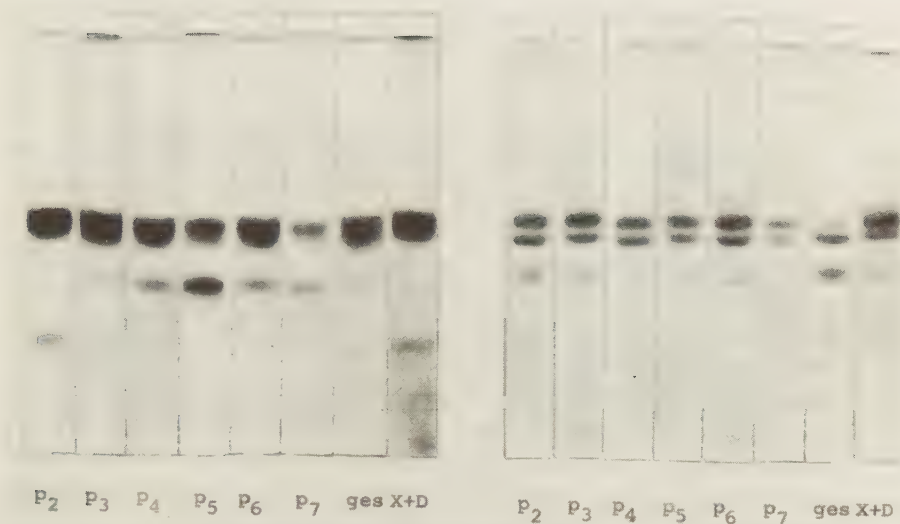


Abb. 9 Auftrennung von Fraktion C des Plasmaüberstandes an DEAE-Cellulose. SDS-Gelelektrophorese der mit verschiedenen Pufferstufen erhaltenen Fraktionen

links: nicht reduzierte Proben; 3.5 %ige Gele, 8 Std.
rechts: DTE-reduzierte Proben; 7.5 %ige Gele, 10 Std.
Als Referenzsubstanz wurde ein Gemisch aus Fragment X und D ("X+D") mitgeführt. Die mit Startpuffer p_1 erscheinende, mengenmäßig sehr kleine Fraktion wurde nicht berücksichtigt.

Im nicht reduzierten Zustand wanderten die Fraktionen p_1 bis p_7 als Banden mit der Mobilität von Fragment X, das bei der Plasminolyse von Fibrinogen oder Fibrinmonomer entsteht (siehe Vergleichspräparat in Abb. 9). In der mit Pufferstufe p_2 erhaltenen Fraktion trat als rascher wandernde Banden Fragment D, in den mit p_3 bis p_7 eluierten auch Fragment Y zusätzlich auf. Eine Bande mit der Mobilität des intakten Fibrinogens wurde in keiner der Unterfraktionen beobachtet.

Nach Reduktion mit DTE wurden neben einzelnen Begleitbanden, die von stärker abgebauten Ketten herrührten, in allen Fraktionen das für Fragment X charakteristische Bandenmuster

(das sich vom Bandenmuster des Fragmentes Y nur geringfügig unterscheidet) festgestellt. Auch nach DTE-Reduktion kein Hinweis auf die drei intakten Untereinheiten von Normalfibrinogen.

Untersuchungen an der an DEAE-Cellulose aufgetrennten Fraktion B des Plasmaüberstandes (nicht dargestellt) zeigten, daß das Material neben Kleinstmengen Fragment X und Y in der Hauptsache verschiedene nicht-fibrinogene Begleitproteine mit schwächerer Affinität zu Fibrinmonomer enthielt. Interessanterweise wurde hier, wie bereits in der Fraktion B aus Rohfibrinogen Fraktion I-O (vgl. Abschnitt I.2), der hochmolekulare, nicht-fibrinogene Plasmabestandteil vorgefunden. Das regelmäßige Auftreten dieser Komponente als Begleitprotein vorgereinigter Fibrinogen-Fraktionen gab Anlaß zu ihrer weiteren Untersuchung, die schließlich zu ihrer Identifizierung geführt hat.

4. Identifizierung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) als Begleitkomponente von Fibrinogen

Als eine gut zugängliche Fraktion, in der das verschiedentlich erwähnte, hochmolekulare Plasmaprotein enthalten war, erwies sich die bei 37 °C mit Auftragspuffer desorbierbare Fraktion B, die bei der Affinitätschromatographie von Gesamtplasma an immobilisiertem Fibrinmonomer anfällt. Sie wurde an DEAE-Cellulose weiter fraktioniert und die Einzelfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die entsprechenden Bandenmuster sind in Abb. 10 dargestellt. Eine halbquantitative Auswertung des DEAE-Chromatogramms ist in Tab. 5 am Ende dieses Abschnittes angeführt.

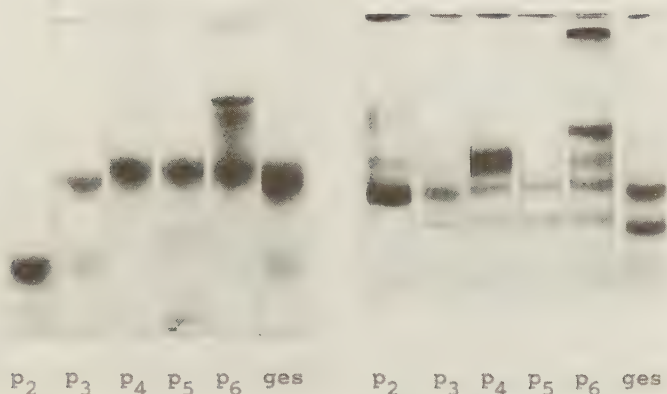


Abb. 10 Auftrennung der Fraktion B aus Gesamtplasma an DEAE-Cellulose. SDS-Gelelektrophorese der mit verschiedenen Pufferstufen erhaltenen Fraktionen

links: nicht reduzierte Proben; 3.5 %ige Gele, 8 Std.
rechts: DTE-reduzierte Proben; 7.5 %ige Gele, 12 Std.
Die mit Pufferstufe p_7 erscheinende, mengenmäßig sehr kleine Fraktion wurde nicht berücksichtigt.

Das bislang unbekannte hochmolekulare Plasmaprotein erschien in der mit p_6 eluierten Fraktion nach SDS-Gelelektrophorese als langsam wandernde Bande im Gemisch mit fibrinogenem Material. Auch in dieser Fraktion B wurden, wie bereits in der B-Fraktion von Fraktion I-O (vgl. Abschnitt I.2) partiell abgebautes fibrinogenes Material, vermischt mit anderen Fremdproteinen (Immunglobuline in p_2 ; Albumin in p_4 etc.), nachgewiesen.

Die mit Pufferstufe p_6 erhaltene Proteinfraktion aus Fraktion B von Gesamtplasma wurde zur Identifizierung der hochmolekularen Plasmakomponente mit einer Reihe hochmolekularer Plasmaproteine bzw. den dagegen gerichteten Antiseren elektrophoretisch und immunologisch verglichen. Abb. 11 zeigt das abschließende Ergebnis dieser Untersuchungen, nämlich die Identität dieses Plasmabestandteils mit "Kälte-unlöslichem Globulin (CIG)".

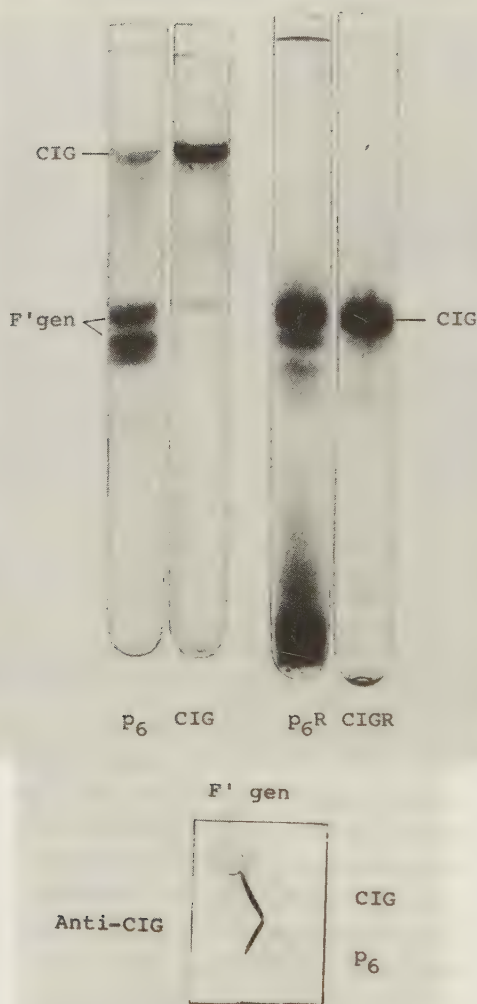


Abb. 11 Identifizierung von CIG als Bestandteil der Fraktion B aus Gesamtplasma

oben: SDS-Gelelektrophorese von Fraktion p₆ der Fraktion B im Vergleich mit einem authentischen CIG-Vergleichspräparat. 3.5 %ige Gele, 10 Std.; R = Proben nach DTE-Reduktion.
 unten: Geldiffusion von Fraktion p₆ der Fraktion B im Vergleich mit einem authentischen CIG-Vergleichspräparat und CIG-freiem Fibrinogen (F'gen) gegen authentisches, monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum.

Nach SDS-Gelelektrophorese ergab die p_6 -Fraktion vor und nach DTE-Reduktion eine Bande derselben Mobilität wie das authentische CIG-Vergleichspräparat, das uns freundlicherweise von der Fa. Behringwerke AG, Marburg, zur Verfügung gestellt worden war (Abb. 11, oben). In der Geldiffusion wurde neben einer positiven Immunreaktion gegenüber Anti-Human-Fibrinogen-Antiserum (nicht dargestellt) eine einzige Präzipitationslinie gegenüber dem authentischen Anti-Human-CIG-Antiserum (Gabe der Fa. Behringwerke AG, Marburg) festgestellt. Sie bog in Form einer Rundung in die vom CIG-Vergleichspräparat und dem Antiserum gebildeten Linie zum Zeichen einer "kompletten immunologischen Identität" ein. Mitgeführtes Fibrinogen ergab mit authentischem Anti-Human-CIG-Antiserum keine positive Immunreaktion. Durch diese Experimente war die regelmäßig als Begleitprotein von Fibrinogen auftretende höhermolekulare Komponente als Kälte-unlösliches Globulin (CIG) ausgewiesen. Durch das Fehlen der Präzipitationslinie gegenüber Fibrinogen war gezeigt, daß die Immunreaktion nicht, mangels Spezifität des Antiserums, von einer Fibrinogen-Anti-Fibrinogen-Reaktion herrührt und daß das hochmolekulare Plasmaprotein mit Fibrinogen immunologisch nicht verwandt ist.

Kälte-unlösliches Globulin (CIG) hat während der Durchführung dieser Untersuchungen weites Interesse erfahren, so daß sich spätere Abschnitte dieser Arbeit mit diesem Plasmafaktor und seiner Bedeutung innerhalb des Bindegewebs- und des Gerinnungssystems ausführlich befassen werden.

5. Schlußbetrachtung

Mit dem in Abschnitt I.1 beschriebenen und im Anschluß daran angewandten abgestuften Trennsystem war ein Konzept gefunden, verschiedene Fibrinogenderivate in reiner Form durch Chromatographie von Rohfibrinogen an DEAE-Cellulose zu isolieren. Von Vorteil war in einigen Fällen die vorgeschaltete Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer mit zweistufiger Desorption (vgl. Abschnitt I.2), durch die das Material hinsichtlich seiner Affinität zum Säulenmaterial vorfraktioniert wurde.

Um weitere Aussagen zur Systematik der Auftrennung zu erhalten, wurden Fibrinogenfraktionen unterschiedlicher Herkunft, aber auch nicht-fibrinogenes Material an DEAE-Cellulose chromatographiert. Das Ergebnis dieser vergleichenden Untersuchungen ist in Tab. 5 zusammengefaßt.

Zum chromatographischen Verhalten von nicht-fibrinogenen Proteinen ist hier erwähnenswert, daß Albumin mit p_5 und p_6 eluiert wird. Dieser Plasmabestandteil war bereits in Abschnitt I.1 zusammen mit partiell abgebautem Fibrinogen, das mit diesen Pufferstufen erschien, aufgetreten. Aufgrund seines Molekulargewichtes von 6.5×10^4 kann es in den Fraktionen nach DTE-Reduktion in den elektrophoretischen Trennbildern die intakte Fibrinogen- α -Kette (MW ebenfalls 6.5×10^4) vortäuschen. Immunglobulin G, ein weiterer Bestandteil von Rohfibrinogen, wurde unter den chromatographischen Bedingungen hauptsächlich mit p_2 und p_3 erhalten. CIG wurde in erster Linie in der mit Pufferstufe p_6 eluierten Fraktion und nur geringfügig in Fraktion p_7 festgestellt. Aus der Verschiedenheit der untersuchten Präparate lassen sich bezüglich der Auftrennung von Fibrinogen und seinen Derivaten folgende Aussagen treffen:

1. Normalfibrinogen läßt sich an DEAE-Cellulose unter Einbeziehung der Methode der Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer chromatographisch gut von partiell abgebautem Fibrinogen bzw. Fibrinogen-Spaltprodukten abtrennen. In einigen Fällen sind einheitliche Fibrinogenderivate isoliert worden.
2. Partiiell abgebaute Fibrinogene erscheinen je nach Abbaugrad gegenüber Normalfibrinogen erst in den späteren Fraktionen des Gradienten. Dieses Ergebnis wurde durch Chromatographie verschiedener Modellsubstanzen (Fraktion I-5, Fragment X) bestätigt.
3. Gewisse partiell abgebaute Fibrinogen- bzw. Fibrinderivate können offensichtlich eng vergesellschaftet mit Albumin und CIG auftreten. Solche Assoziate verhalten sich chromatographisch etwas anders als die Einzelkomponenten.

Aufgetrenntes Material	Einzelfraktionen erhalten mit					
	p ₂	p ₃	p ₄	p ₅	p ₆	p ₇
Fraktion I-O						
aus Plasma	++	+	+	+	++	+
Plasmaüberstand						
Fraktion C	+	++	++	+	+	+
Plasmaüberstand						
Fraktion B	+++	+	+	+	+	+
Fraktion C						
aus Plasma	++	+	+	+	++	+
Fraktion B						
aus Plasma	++	+	+	+	++	+
Fraktion I-5						
aus Plasma	++	+++	-	+	+	+
X-Fragment						
aus Plasminolyse	-	+++	++	+	+	+
Albumin	-	-	+++	++	+	+
Immunglobulin G	+++	++	+	-	-	+
CIG	-	-	-	-	+++	+

Tabelle 5 Zusammenfassende Darstellung von Experimenten zur Chromatographie an DEAE-Cellulose. Halb-quantitative Auswertung des Anteils der Einzel-fractionen am Gesamtmaterial

Fraktion I-O aus Plasma: Plasma mit 2.1M Glycin bei 4 °C gefällt, Niederschlag; Plasmaüberstand: Überstand von Fraktion I-O; Fraktion I-5: Leichtertlösliche Fibrinogenfraktion, erhalten durch fraktionierte Fällung aus Plasma nach Mosesson und Sherry (29); X-Fragment: hergestellt durch Plasminolyse von Fibrinogen nach Marder et al. (39); Fraktion B: Affinitätschromatographie an Fibrinmonomer, Desorption mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 37 °C; Fraktion C: Affinitätschromatographie an Fibrinmonomer, Desorption mit 0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C.

II. Zur Struktur von Fibrinogen und seinen Derivaten

Verknüpft mit der Fraktionierung von Fibrinogen auf chromatographischem Wege wurden eine Reihe Untersuchungen zur Struktur von Fibrinogen und seinen Derivaten angestellt, die sich aus dem vorhergegangenen Abschnitt ergaben.

1. Es wird das Problem der Assoziation von Albumin und Fibrinogen, das bei der Fraktionierung von Plasmafibrinogen wiederholt auftrat, weiter verfolgt. Dabei werden Evidenzen erbracht, die für eine kovalente Bindung von Albumin an bestimmte Fibrinogenderivate sprechen.
2. Die Experimente zur Vorfraktionierung von Fibrinogen durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer veranlaßten Untersuchungen mit dem Ziel, die Haftstelle im Fibrinogen, die für die Wechselwirkung zu Fibrinmonomer verantwortlich ist, in ihrer Lage auf einen kleinen Bereich der Fibrinogen- γ -Kette einzugrenzen.
3. Disulfidschleifen innerhalb der Peptidkette stellen möglicherweise "affine" Regionen von Proteinen gegenüber anderen dar. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Lage der Haftstelle von Fibrinogen zu Fibrinmonomer wird über eine neuartige partielle Spaltung in Gegenwart von Harnstoff berichtet, bei der ein Teil der intrachainaren Disulfidschleifen erhalten bleibt, alle interchainaren Disulfidbrücken jedoch gespalten werden.

1. Partielle Reduktion in Gegenwart von Harnstoff

Partielle Spaltungen der Disulfide im Fibrinogen in Abwesenheit von Harnstoff sind von Budzynski und Stahl (19) und von Blomback et al. (144) beschrieben worden. Dabei werden nur wenige Disulfidbindungen gespalten, die zu keiner Verkleinerung des Molekulargewichtes führen. Im folgenden wird über eine partielle Reduktion unter milden Bedingungen in Gegenwart von Harnstoff berichtet.

1.1 Methode

Die Disulfidbindungen von Albumin und Fibrinogen wurden einer milden Reduktion in Gegenwart von 8M Harnstoff unterworfen, mit dem Ziel, nur eine partielle Reduktion zu erreichen. Die freigesetzten Thiolgruppen wurden carboximethyliert. Anschließend wurde das carboximethylierte Material einer vollständigen Reduktion zugeführt und die restlichen SH-Gruppen aminoäthylisiert ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.1.1 und 1.5). Mit diesem zweistufigen Vorgehen ist die Möglichkeit der Unterscheidung der labileren Disulfidbindungen von den stabileren in einem Protein gegeben. Erstere werden in Carboximethyl-Cystein (CMC), letztere in Aminoäthyl-Cystein (AEC) übergeführt. Der Anteil beider Cysteinderivate läßt sich aus der Aminosäureanalyse der Präparate quantitativ bestimmen.

Zur partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff wurde das Protein mit einer Konzentration von 7 - 10 mg / ml in einer 8M Harnstofflösung bei pH 4.5 (mit HCl eingestellt) gelöst und Merkaptoessigsäure (Thiolglycolsäure) bis zu einer Endkonzentration von 0.1M unter Stickstoff zugegeben. Der pH-Wert wurde mit Ammoniak auf 4.5 nachgestellt und das Reaktionsgemisch 24 Stunden unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Carboximethylierung der freigesetzten Thiolgruppen mußte das pH des Spaltgemisches auf 8.5 gebracht werden, da bei niedrigem pH eine unerwünschte Reaktion von Jodacetat mit verschiedenen NH_2 -Gruppen im Protein eintritt. Diese zwangsläufige pH-Erhöhung bei der chemischen Blockierung der Thiolgruppen in Gegenwart von überschüssigem Reduktionsmittel hatte in einigen Vorversuchen eine Weiterreaktion bis zur vollständigen Reduktion des Materials zur Folge. Um dies zu verhindern, wurde ein neues Verfahren zur Carboximethylierung des partiell gespaltenen Proteins auf einer kleinporigen Molekularsieb-Säule ausgearbeitet.

Das Prinzip besteht darin, daß sich die höhermolekularen Reduktionsprodukte zunächst infolge ihrer rascheren Wanderungsgeschwindigkeit auf der Säule aus ihrer reduzierenden Umgebung heraus bewegen, ohne daß Reoxidation eintritt. Anschließend wandern sie durch eine Jodacetatzone hindurch, wo bei pH 8.5 die Carboximethylierung ihrer SH-Gruppen erfolgt.

Dazu wurde auf eine mit 0.1M Tris-HCl pH 8.5 in 8M Harnstoff äquilibrierte Sephadex G-25-Säule (Pharmacia), die vor Lichteinstrahlung geschützt war, zunächst eine Jodacetatzone, dann eine 1. ungepufferte Trennzone und schließlich das Material aus der partiellen Spaltung aufgebracht. Nach dem Auftragen einer zweiten ungepufferten Trennzone wurde mit 0.1M Tris-HCl pH 8.5 in 8M Harnstoff eluiert. Durch das Aufbringen der beiden ungepufferten Trennzonen vor und hinter der Proteinfraktion wurde ein zu frühes Ansteigen des pH-Wertes in der Umgebung der Reduktionsprodukte verhindert.

In Tab. 6 sind Zusammensetzung der einzelnen Zonen und das jeweilige Auftragsvolumen zusammengestellt. Abb. 12 zeigt ein charakteristisches Elutionsprofil und den Verlauf des pH-Wertes der auf der Säule ausgeführten Carboximethylierungsreaktion.

Zone	Zusammensetzung	Volumen (ml)
Jodacetatzone	0.1M Tris-HCl, 0.1M Jodacetat pH 8.5 in 8M Harnstoff	16
1. Trennzone	8M Harnstoff, ungepuffert, pH 4.5	8
Substanzzone	aus der partiellen Reduktion	10
2. Trennzone	8M Harnstoff, ungepuffert, pH 4.5	6

Tabelle 6 Carboximethylierung von partiell reduziertem Protein auf einer Sephadex G-25-Säule.

Die Angaben beziehen sich auf eine 2 x 100 cm große Säule, einen Durchfluß von 32 ml / Std. und 100 mg aufgetragenes, in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziertes Protein in 10 ml Reduktionspuffer. Vor dem Aufbringen der Jodacetatzone war die Säule mit 0.1M Tris-HCl in 8M Harnstoff, pH 8.5, äquilibriert; Nach Auftragen der zweiten Trennzone erfolgte mit dem gleichen Puffer die Elution.

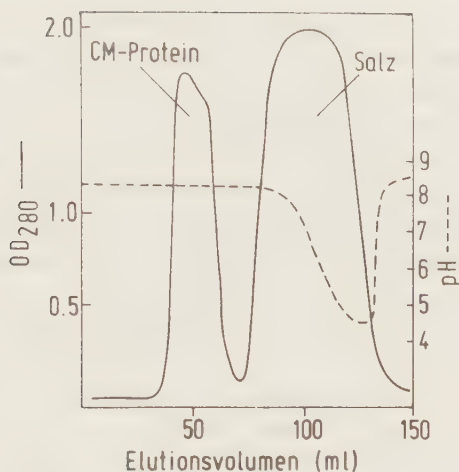


Abb. 12 Elutionsprofil zur Carboximethylierung von partiell reduziertem Protein auf einer Sephadex G-25-Säule

Die Angaben beziehen sich auf eine 2 x 100 cm große Säule, einen Durchfluß von 32 ml / Std. und 100 mg aufgetragenes, in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziertes Protein in 10 ml Reduktionspuffer.

Die carboximethylierte Proteinfraction erschien, obwohl zeitlich später auf die Säule gebracht, noch vor dem grossen Salzgipfel im Eluat. Der pH-Wert der Protein-haltigen Fraktionen betrug konstant 8.5, Schwankungen traten erst in den gut abgetrennten, salzhaltigen Fraktionen des Chromatogramms auf.

1.2 Albumin als Modells substanz

Die Methode der zweistufigen Reduktion zur Unterscheidung von labilen und stabilen Disulfidbindungen wurde im folgenden auf humanes Serumalbumin angewandt.

Albumin (Übersicht siehe 145) ist ein Plasmaprotein mit Molekulargewicht 6.5×10^4 , das aus einer einzigen Peptidkette besteht. Innerhalb des Moleküls kommen 17 Disulfid-

schleifen und eine SH-Gruppe vor (146). Das Protein wurde einerseits vollständig gespalten und der Cysteingehalt als CM-Cystein bestimmt. Eine andere Probe wurde der partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff unterworfen, die freigeordneten SH-Gruppen nach der in Abschnitt II.1 beschriebenen Methode auf der Säule carboximethyliert und auf den Gehalt von CM-Cystein untersucht. Eine dritte Probe wurde partiell gespalten und carboximethyliert, anschließend wurde vollständig nachgespalten und die restlichen Thiolgruppen des Albumins mit Äthylenimin in Aminoäthyl-Cystein überführt. Die drei unterschiedlich reduzierten Albuminfraktionen wurden zunächst in ihrem chromatographischen Verhalten an CM-Cellulose in Gegenwart von 8M Harnstoff unter Verwendung eines linearen Natriumacetat-Gradienten verglichen. Die erhaltenen Elutionsprofile sind in Abb. 13 gegenübergestellt.

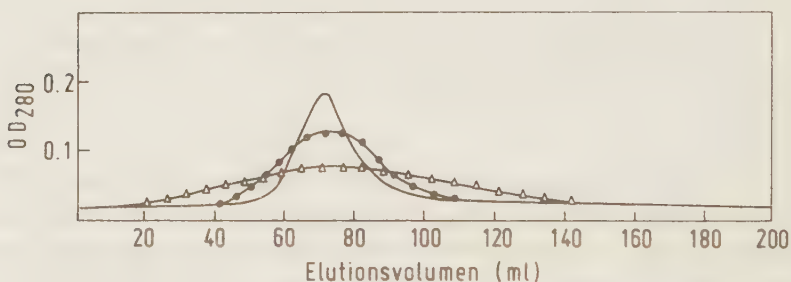


Abb. 13 Chromatographie von partiell und vollständig reduziertem Albumin an CM-Cellulose

— : Albumin, vollständig reduziert und carboximethyliert;
●-●-● : Albumin, in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziert und carboximethyliert;
Δ-Δ-Δ : Albumin, zunächst in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziert und carboximethyliert, anschließend vollständig reduziert und aminoäthyliert;
Säule: 0.8 x 25 cm; Durchfluß: 12.6 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 30 mg Protein in 6 ml Startpuffer; Elution: linearer Natriumacetat-Gradient (0.005M gegen 0.1M) in 8M Harnstoff.

Das partiell reduzierte und carboximethylierte Material wies, verglichen mit dem vollständig gespaltenen, ein ähnliches chromatographisches Verhalten an CM-Cellulose auf. Nach Spaltung der restlichen Disulfidbindungen und Aminoäthylisierung wurde eine starke Verbreiterung des Elutionsgipfel beobachtet. Dieses geänderte chromatographische Verhalten scheint für gleichzeitig carboximethylierte und aminoäthylierte Präparate typisch zu sein. Nähere Aussagen zum Gehalt der verschiedenen Cysteinderivate lieferte die Aminosäureanalyse der unterschiedlich behandelten Albumine. Die erhaltenen CM-Cystein- und AE-Cysteinwerte sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Art der Spaltung	Alkylierung	CMC	AEC
Vollständige Reduktion	Jodacetat	35.5	.-
Partielle Reduktion	Jodacetat	28.9	.-
1. Partielle Reduktion	Jodacetat		
2. vollständige Reduktion	Äthylenimin	28.6	6.2

Tabelle 7 Cysteinreste im vollständig und partiell reduzierten Albumin (Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Protein).

CMC: Carboximethyl-Cystein; AEC: Aminoäthylcystein.

Unter den Bedingungen der partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff wurden offensichtlich 14 der insgesamt 17 intramolekularen Disulfidschleifen des Albumins gespalten, während die restlichen drei Disulfidschleifen erst unter den Bedingungen der vollständigen Spaltung reduziert und als AE-Cystein erfaßt werden. Die ungeraden CM-Cysteinwerte in Tab. 7 rühren von der freien Thiolgruppe her, welche im nativen Protein teilweise substituiert vorliegt (146).

1.3 Anwendung auf Fibrinogen

Fibrinogen ist ein komplizierter aufgebautes Molekül und besteht aus drei paarweise vorkommenden Peptidketten, die über Disulfide verbrückt sind. Daneben liegen auch Disulfidschleifen innerhalb der Ketten vor. Nach neuesten Sequenzdaten befinden sich im nativen Protein 64 halbe Cysteinreste, von denen vermutlich 18 - 20 als intrachainare Disulfidschleifen vorliegen, während der Rest die sechs Peptidketten zusammenhält (12-15).

Fibrinogen wurde, wie in Abschnitt 1.2 Albumin, der vollständigen Reduktion, der partiellen Reduktion und der partiellen Reduktion mit vollständiger Nachspaltung unterworfen, wobei beim zweistufigen Verfahren wieder zunächst carboximethyliert und anschließend aminoathyliert wurde. Die drei Reduktionsprodukte wurden in der SDS-Gelelektrophorese untersucht und an CM-Cellulose in Gegenwart von 8M Harnstoff unter Verwendung eines linearen Natriumacetatgradienten chromatographiert. Im oberen Teil von Abb. 14 sind die elektrophoretischen Trennbilder, im unteren Teil ist das chromatographische Verhalten der drei unterschiedlich behandelten Fibrinogenpräparate dargestellt.

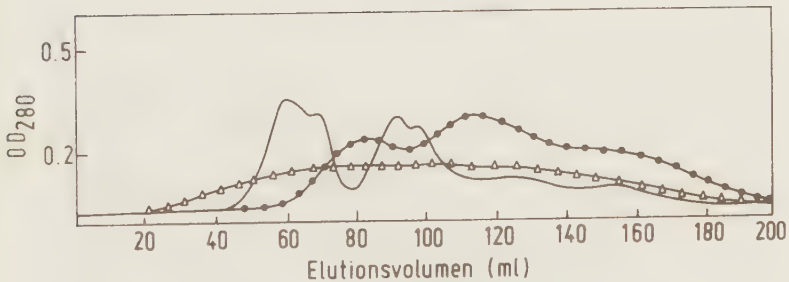
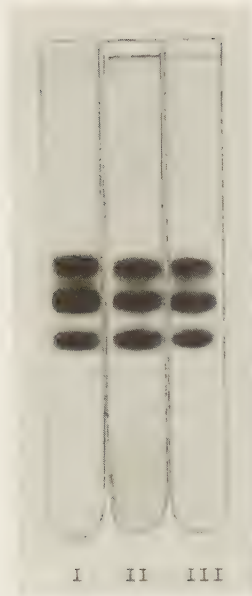


Abb. 14 Fibrinogen, partiell und vollständig reduziert
oben: SDS-Gelelektrophorese. 5 %ige Gele, 10 Std.
unten: Chromatographie an CM-Cellulose
I bzw. ———: Fibrinogen, vollständig reduziert und carboximethyliert;
II bzw. ●-●-●: Fibrinogen, in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziert und carboximethyliert;
III bzw. Δ-Δ-Δ: Fibrinogen, in Gegenwart von Harnstoff partiell reduziert und carboximethyliert, anschließend vollständig reduziert und aminoäthyliert;
Säule: 0.8 x 25 cm; Durchfluß: 12.8 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 30 mg Protein in 6 ml Startpuffer; Elution: linearer Natriumacetat-Gradient (0.005M gegen 0.1M) in 8M Harnstoff.

Das partiell gespaltene Material (II) wies, wie die beiden vollständig gespaltenen Präparate (I und III), nach SDS-Gelelektrophorese die drei Untereinheiten von Fibrinogen auf, ohne daß eine von Gesamtfibrinogen herrührende hochmolekulare Bande zu beobachten war. Damit ist gezeigt, daß unter den Bedingungen der partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff alle interchainaren Disulfidbindungen des Fibrinogens gespalten werden. Daneben wurde, analog zum Albumin, ein völlig verändertes chromatographisches Verhalten für das nachgespaltene Material, verglichen mit dem vollständig gespaltenen Material erhalten. Das partiell reduzierte Fibrinogen ergab wieder ein dem vollständig reduzierten sehr ähnliches, jedoch etwas schlechter getrenntes Elutionsprofil. Im Falle des nachgespaltenen und aminoäthylierten Fibrinogens waren die drei distinkten Gipfel, die den drei Untereinheiten entsprechen, nicht mehr zu erkennen.

Zuletzt wurde die Aminosäurezusammensetzung der drei unterschiedlich behandelten Fibrinogene festgestellt. Die Auswertung bezüglich der CM-Cystein- und AE-Cysteinwerte ist in Tab. 8 dargestellt.

Art der Spaltung	Alkylierung	CMC	AEC
Vollständige Reduktion	Jodacetat	64.6	.-
Partielle Reduktion	Jodacetat	52.6	.-
1. Partielle Reduktion	Jodacetat		
2. vollständige Reduktion	Äthylenimin	53.2	11.2

Tabelle 8 Cysteinreste im vollständig und partiell reduzierten Fibrinogen (Angaben in Mol Aminosäure pro Mol Protein).

CMC: Carboximethyl-Cystein; AEC: Aminoäthyl-Cystein.

Im Fibrinogen wurden unter den Bedingungen der partiellen Reduktion in Gegenwart von Harnstoff 5 - 6 der intrachainaren Disulfidschleifen nicht gespalten. Anhand der SDS-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 14) war gezeigt worden, daß im partiell reduzierten Fibrinogen bereits alle interchainaren Disulfidbrücken getrennt sind.

2. Charakterisierung von kovalenten Fibrinogen-Albumin-Assoziaten

Bei der Affinitätschromatographie von Rohfibrinogen an Fibrinmonomer-Sephrose trat eine Fibrinogenfraktion mit starker Affinität zum Säulenmaterial auf (CI-Fraktion), die für hochgereinigtes Fibrinogen einen zu geringen Gehalt an α -Ketten, sowie eine etwas verringerte Gerinnbarkeit aufwies (vgl. Tab. 4). Das Material wurde im DEAE-Stufengradienten-System chromatographiert und die erhaltenen Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. In Abb. 15 sind die elektrophoretischen Trennbilder dargestellt.

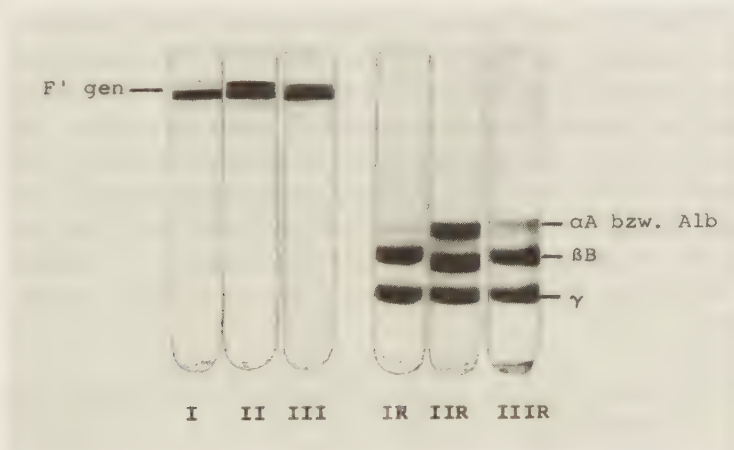


Abb. 15 SDS-Gelelektrophorese von Fraktionen, die bei der Auftrennung von Fraktion CI (vgl. Abschnitt I.2) an DEAE-Cellulose erhalten worden waren.

I : gilt für die Fraktionen p₂, p₅, p₆ und p₇;
II : gilt für die Fraktionen p₃ und p₄;
III: Gesamtfraktion CI;
7.5 %ige Gele, 8 Std.; R = Proben nach DTE-Reduktion

Im reduzierten Zustand wurden zwei Bandenmuster gefunden: Im einen, das für die mit p_2 , p_5 , p_6 und p_7 eluierten Fraktionen gilt, tritt keine diskrete Bande im Bereich der Fibrinogen- α -Ketten auf (IR). Offensichtlich liegt ein partiell-abgebautes F'gen vor, bei dem diese Untereinheit auf die Länge der β -Kette verkürzt ist. Das andere Bandenmuster entspricht mit den drei etwa gleich starken Banden dem des intakten Normalfibrinogens (IIR). Es wird für die mengenmäßig recht geringen, mit p_3 und p_4 eluierbaren Fraktionen gefunden. Im nicht reduzierten Zustand treten lediglich im Fibrinogen-Bereich Banden auf, nichts, was auf niedrigmolekulare Bestandteile schließen läßt.

Im Abschnitt I.5 war darauf hingewiesen worden, daß reduziertes Albumin in der SDS-Gelelektrophorese vergleichbar wie die α -Kette von Fibrinogen wandert und sie somit vortäuschen kann. Andererseits wird intaktes Normalfibrinogen stets in den Anfangsfraktionen des Stufengradienten gefunden, während freies Albumin in den mittleren Fraktionen auftritt (vgl. Tab. 5). Die Tatsache, daß eine Fibrinogenfraktion, die nach DTE-Reduktion Banden im Bereich der drei intakten Untereinheiten $A\alpha$, $B\beta$ und γ ergab, erst mit den Pufferstufen p_4 und p_5 eluiert wird, war als Hinweis gewertet worden, daß bestimmte (partiell abgebaute) Fibrinogenderivate als schwer dissoziierbare Assoziate, beispielsweise mit Albumin, vorkommen können. Das Molekulargewicht solcher Komplexe entspräche weitgehend dem von Normalfibrinogen. Im folgenden sollen Evidenzen für eine Assoziation beider Proteine erbracht werden.

2.1 Immunologische Untersuchungen an Fibrinogen-Albumin-Komplexen

Eine Rohfibrinogenpräparation, die in der SDS-Gelelektrophorese kein freies Albumin aufwies, wurde an Biogel A 5-Agarose chromatographiert. In einem parallelen Säulenlauf wurde ein Gemisch Rohfibrinogen-Albumin im Gewichtsverhältnis 1:1, das 30 Minuten bei 37 °C inkubiert war, desselben Gesamt-

proteingehaltes aufgetrennt. Die beiden Elutionsprofile A und B sind im oberen Teil von Abb. 16 dargestellt. Anschließend wurden die Einzelfraktionen beider Trennungen in der Immunelektrophorese gegen monospezifisches Anti-Human-Albumin- und gegen Anti-Human-Fibrinogen-Antiserum getestet. Im Test gegen Anti-Albumin-Antiserum wurden im Verlauf des Chromatogramms zwei unterschiedliche Arten von Immunreaktionen beobachtet (Abb. 16, unterer Teil).

Die Fraktionen im markierten Bereich des kleineren Gipfels im Elutionsprofil B lieferten nach Immunelektrophorese gegen Anti-Human-Albumin-Antiserum einen Präzipitationsbogen im α -Globulinbereich, welcher aus der Immunreaktion von "freiem" Albumin mit dem Antiserum stammt. Analoge Fraktionen im Elutionsprofil A ergaben diese Reaktion nicht. Diese Präparation enthielt offensichtlich kein "freies" Albumin. Daneben fanden sich in beiden Präparationen Anteile, die mit Anti-Albumin-Antiserum eine Immunreaktion im Bereich der β -Globulinfraktion ergaben, welche möglicherweise auf "gebundenes" Albumin schließen läßt. Dieser Typ trat in den markierten Bereichen des größeren Proteingipfels beider Chromatogramme von Abb. 16 auf. Alle Fraktionen, bei denen dieser Typ von Immunreaktion anzutreffen war, ergaben in der Immunelektrophorese gegen Anti-Human-Fibrinogen-Antiserum eine positive Reaktion auf fibrinogenes Material.

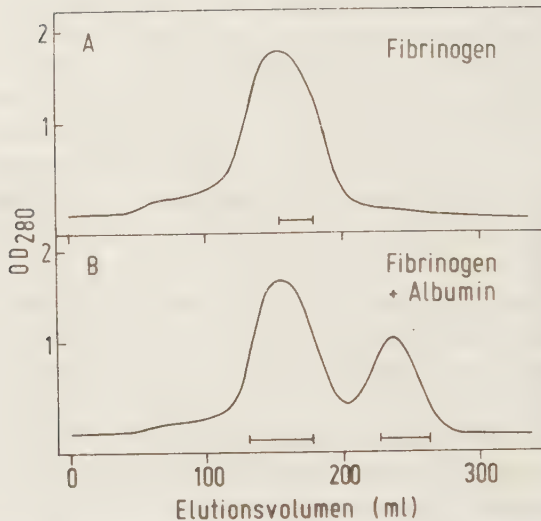


Abb. 16 Nachweis von Fibrinogen-gebundenem Albumin

oben: Chromatographie an Biogel A-5m

Elutionsprofil A: Fibrinogen ohne Albuminzusatz

Elutionsprofil B: Fibrinogen mit Albuminzusatz (1:1, w / w)

Die Bereiche im Chromatogramm mit positiver Reaktion gegenüber monospezifischem Anti-Human-Albumin-Antiserum sind mit ————— markiert.

Säule: 2 x 100 cm; Durchfluß: 26,4 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 100 mg Protein in 10 ml Elutionspuffer; Elutionspuffer: 0,2M Phosphat pH 7,0

unten: Erkennung der Albumin-haltigen Bereiche durch Immunelektrophorese gegen Anti-Human-Albumin-Antiserum.

Positive Reaktion auf "gebundenes" Albumin in den markierten Fraktionen des größeren Gipfels von Elutionsprofil A und B; positive Reaktion auf "freies" Albumin in den markierten Fraktionen des kleineren Gipfels von Elutionsprofil B.

In Abb. 17 ist die Immunelektrophorese der beiden chromatographierten Ausgangsmaterialien gegen Anti-Albumin- und gegen Anti-Fibrinogen-Antiserum dargestellt.

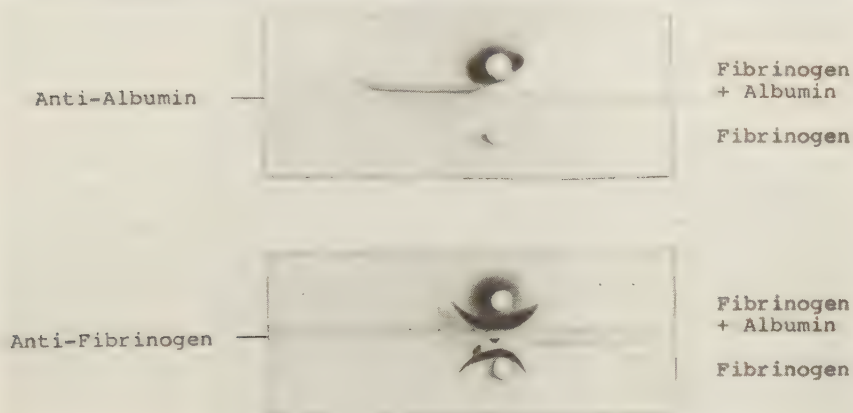


Abb. 17 Immunelektrophorese von Rohfibrinogen mit und ohne Albuminzusatz gegen Anti-Human-Albumin-Antiserum (oben) und gegen Anti-Human-Fibrinogen-Antiserum (unten).

Die bei 37 °C inkubierte Mischung aus Fibrinogen und Albumin lieferte gegen Anti-Human-Albumin-Antiserum im Anschluß an den Albumin-Präzipitationsbogen im α -Globulinbereich einen in den β -Globulinbereich hineinreichenden Sporn zum Zeichen einer "partiellen Identität". Die Fibrinogenpräparation ohne Albuminzusatz zeigte lediglich die in Abb. 16 unten bereits beschriebene Immunreaktion im β -Globulinbereich. In der Immunelektrophorese gegen Anti-Fibrinogen-Antiserum zeigten beide Präparate an derselben Stelle einen kräftigen Präzipitationsbogen.

Diese immunologischen Befunde bedeuten, daß in der Rohfibrinogenpräparation ein kleiner Teil von Fibrinogen als starkes Assoziat mit Albumin vorkam. "Freies" Albumin ist, Abb. 16 bzw. 17 zufolge, in diesem Präparat nicht enthalten.

Durch Zusatz von Albumin ließ sich der chromatographische Bereich, in dem das offensichtlich Fibrinogen-gebundene Albumin gefunden wurde, noch erweitern. Hochgereinigte Fibrinogenpräparationen zeigten keine der beiden Immunreaktionen mit Anti-Albumin-Antiserum, in käuflichen Fibrinogenpräparaten fand man beide Typen.

2.2 Partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff

Mit der Immunreaktion von monospezifischem Anti-Albumin-Antiserum mit bestimmten Fibrinogenfraktionen im β -Globulinbereich war eine gute Evidenz für eine Assoziatbildung der beiden Komponenten erbracht worden. Es galt nun die Frage zu klären, ob diesen Komplexen lediglich eine starke Wechselwirkung nicht kovalenter Natur, oder eine durch Disulfidaustausch der freien SH-Gruppe am Albumin induzierte, kovalente Bindung zugrunde liegt.

Aus diesem Grund wurden diejenigen Fraktionen aus den Trennungen A und B, die in der Immunelektrophorese eine positive Reaktion auf "gebundenes" Albumin ergaben (vgl. Abb. 16, oberer Teil, markierte Bereiche), einer partiellen Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff unterworfen. Nach Carboximethylierung in Abwesenheit von Harnstoff wurde das Reaktionsprodukt in der SDS-Gelelektrophorese untersucht. Unter identischen Reduktionsbedingungen wurde auch Albumin als Vergleichssubstanz gespalten. Abb. 18 zeigt die elektrophoretischen Trennbilder.

In der Präparation, die Fibrinogen-Albumin-Komplexe enthalten sollte, traten nach der partiellen Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff in der SDS-Gelelektrophorese einige niedrigmolekulare Banden neu auf (II), die im Ausgangsmaterial vor Reduktion nicht vorhanden waren (I). Im Reduktionsgemisch zeigte eine Bande dieselbe elektrophoretische Mobilität, wie das ähnlich behandelte Albumin-Vergleichspräparat (III).

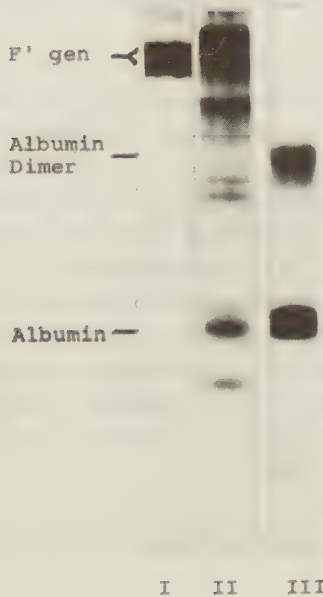


Abb. 18 Abspaltung von Fibrinogen-gebundenem Albumin durch partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff. SDS-Gelelektrophorese.

I : Fibrinogenfraktion (Anti-Albumin-positiv) vor Reduktion;
 II : Fibrinogenfraktion nach Reduktion;
 III: Human-Albumin-Vergleichspräparat nach Reduktion;
 5 %ige Gele, 10 Std.

Die Reduktion von gereinigtem Fibrinogen unter den beschriebenen Bedingungen ergab keine Abspaltung anderer Proteine, ebensowenig führte sie zu den Fibrinogen-Einzelketten. Die Fibrinogenbande zeigte in diesem Fall eine vergleichbare elektrophoretische Mobilität, wie die kräftige, etwas verbreiterte Bande in II. Offensichtlich erfolgt unter den Bedingungen der partiellen Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff

eine Auffaltung der Struktur durch die Spaltung einiger Disulfidbindungen. Die neu hinzugekommene, etwas schneller als Normalfibrinogen wandernde Bande in II ist vermutlich aus dem Fibrinogenderivat hervorgegangen, das Albumin kovalent gebunden hatte.

Mit diesem Experiment wurde die Abspaltung bestimmter, kovalent an Fibrinogen gebundener Proteine unter milden, reduktiven Bedingungen nachgewiesen. Im Reduktionsgemisch trat nach SDS-Gelelektrophorese eine Bande derselben Mobilität wie Albumin auf. Immunologische Methoden zur weiteren Identifizierung konnten nicht herangezogen werden, da das freigesetzte Albumin unter diesen Reduktionsbedingungen praktisch seine gesamten antigenen Determinanten verloren hatte. Ein auf die gleich Weise behandeltes Albuminpräparat zeigte sowohl in der Geldiffusion nach Ouchterlony als auch in der Immunelektrophorese keine positive Reaktion mehr mit Anti-Albumin-Antiserum (vgl. dazu auch 147).

3. Eingrenzung der Haftstelle von Fibrinogen zu Fibrinmonomer

Die Region im Fibrinogen, die zu Wechselwirkung mit seiner modifizierten Form, dem Fibrinmonomer befähigt ist, stellt einen funktionell bedeutsamen Bereich des Moleküls dar. Ihre Existenz erklärt die Aggregationsneigung beider Komponenten. Dabei tritt diese Region mit einer anderen Haftstelle, die nach Abspaltung der Fibrinopeptide entstanden ist (46), in Wechselwirkung.

Haftstellen lassen sich mit der Methode der Affinitätschromatographie erkennen und auf kleinere Bruchstücke eingrenzen. Das Protein, dessen Affinitätsstelle untersucht werden soll, wird unter nicht-denaturierenden fragmentiert und das Gemisch bzw. die isolierten Fragmente auf ihre Wechselwirkung gegenüber einer immobilisierten Komponente getestet. Es treten Bruchstücke auf, welche vom Säulenmaterial adsorbiert werden, da sie die Haftstelle noch besitzen. Daneben findet

man Fragmente, die dazu nicht mehr in der Lage sind, weil ihnen der entsprechende Bereich fehlt.

In diesem Zusammenhang wird hier zunächst über das chromatographische Verhalten von Fragment-Gemischen, die beim Plasminabbau von Fibrinogen entstehen, im Anschluß über das der isolierten Plasmin-Fragmente an immobilisiertem Fibrinmonomer berichtet.

Es wurde ein nach 10 Minuten und ein nach 30 Minuten Plasminolyse von Fibrinogen erhaltenes Abbaugemisch ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.2.1) sowie Fibrinogen zum Zeitpunkt 0 Minuten an immobilisiertem Fibrinmonomer bei 4 °C chromatographiert. Das zurückgehaltene Material wurde bei 4 °C mittels eines kontinuierlichen KBr-Gradienten eluiert. In Abb. 19 sind die erhaltenen Elutionsprofile dargestellt.

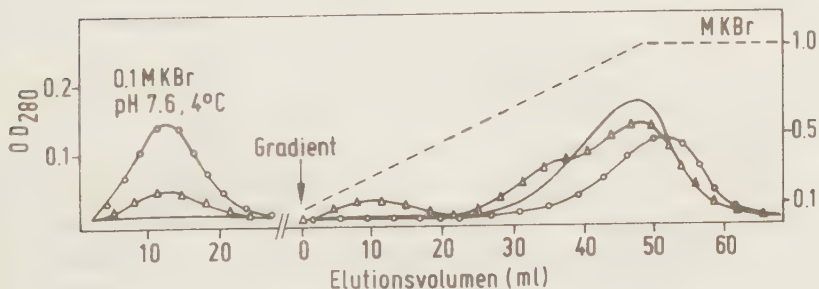


Abb. 19 Affinitätschromatographie von Plasminolyse-Gemischen verschiedenen Abbaugrades von Fibrinogen an immobilisiertem Fibrinmonomer

—: Fibrinogen (nicht abgebaut);
 Δ - Δ - Δ : Fibrinogen nach 10 Min.-Plasminolyse;
 $\circ$ - $\circ$ - $\circ$: Fibrinogen nach 30 Min.-Plasminolyse;
 Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 21 ml / Std.; aufgetragen:
 jeweils 8 mg Protein in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M KBr, 0.025M EACA,
 pH 7.6, 4 °C; Elution: linearer KBr-Gradient (0.1M gegen 1M),
 4 °C.

Die im Zuge der Plasminolyse entstandenen Fibrinogen-Bruchstücke zeigten ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten. Bereits nach 10 Minuten Abbau wurden etwa 20 % des Materials nicht mehr adsorbiert, nach 30 Minuten Abbau betrug dieser Anteil etwa 60 %. Die im KBr-Gradienten eluierbare Fraktion ergab im Falle des 10 Minuten-Abbaues ein ziemlich komplexes Elutionsprofil, in dem, bezogen auf Fibrinogen zum Zeitpunkt 0, schwächer aber auch stärker adsorbierte Komponenten vorlagen. Im 30 Minuten-Abbau trat neben dem nicht zurückgehaltenen Material nur diejenige Fraktion auf, zu deren Elution eine höhere KBr-Konzentration als für das nicht abgebaute Ausgangsmaterial erforderlichlich war.

Zur weiteren Klärung und Zuordnung dieser Befunde wurden isolierte Plasmin-Fragmente als Reinsubstanzen unter denselben Bedingungen im selben Gradienten chromatographiert. Die erhaltenen Elutionsprofile sind in Abb. 20 aufgeführt.

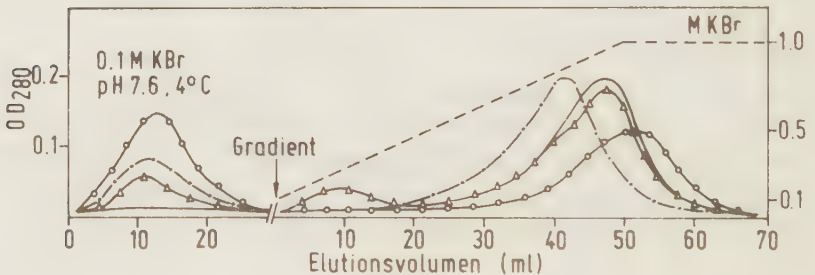


Abb. 20 Affinitätschromatographie von isolierten Fibrinogen-Spaltprodukten an immobilisiertem Fibrinmonomer

—: Fibrinogen (nicht abgebaut); Δ - Δ - Δ : Fragment X;
●-●-●: Fragment Y; o-o-o: Fragment D;
Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 21 ml / Std.; aufgetragen:
jeweils 8 mg Protein in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M KBr, 0.025M EACA,
pH 7.6, 4 °C; Elution: linearer KBr-Gradient (0.1M gegen 1M),
4 °C.

Die adsorbierbare Fraktion von Fragment X erschien bei vergleichbarer KBr-Molarität im Gradienten an derselben Stelle wie intaktes Fibrinogen, während die entsprechende Fraktion von Fragment Y etwas früher und eine D-Fraktion etwas später eluiert wurde. Der Anteil des nicht gebundenen Materials nahm von X nach D stetig zu, die aufgebrauchte E-Fraktion wurde in der Gesamtheit nicht mehr adsorbiert.

Durch die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer wurde gezeigt, daß verschiedene Fragmente eine Heterogenität bezüglich ihrer Affinitätszentren aufweisen. Besonders offensichtlich war dies bei der Chromatographie von Fragment D, von dem eine an Fibrinmonomer nicht mehr adsorbierbare (D I) und eine noch adsorbierbare D-Unterfraktion (D II) erhalten wurde. Demnach ist eine wichtige Haftstelle von Fibrinogen zu Fibrinmonomer auf die D II-Fraktion eingegrenzt. Beide D-Fraktionen wurden in der SDS-Gelelektrophorese im reduzierten Zustand auf Unterschiede in den Kettenlängen untersucht. Die entsprechenden Bandenmuster sind in Abb. 21 dargestellt.

Alle D-Fraktionen wiesen gegenüber Fibrinogen (IV) erheblich verkürzte Restketten auf. Untereinander zeigten sie vergleichbare D_{β} - und D_{α} -Ketten. In der Größe der D_{γ} -Kette unterschieden sich jedoch die nicht adsorbierbare (I) und die adsorbierbare (II) D-Unterfraktion. Die D_{γ} -Kette des zurückgehaltenen Materials (II) war gegenüber der des nicht zurückgehaltenen (I) etwas länger, wobei letztere eine weitere Heterogenität beinhalten. Das Stück aus der D_{γ} -Kette, um das sich die D I-Fraktion von der D II-Fraktion unterscheidet, scheint also Träger der Affinitätsstelle von Fibrinogen zu Fibrinmonomer zu sein.

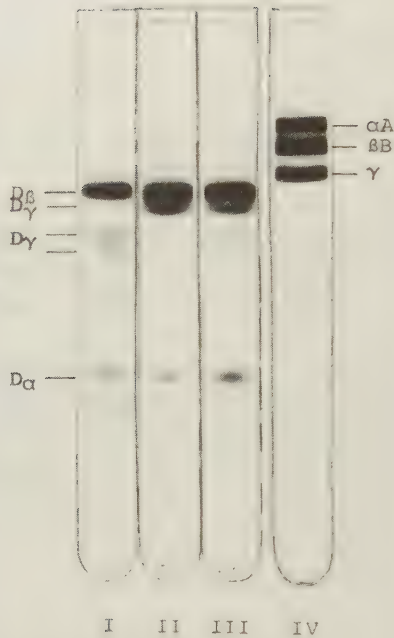


Abb. 21 SDS-Gelelektrophorese der an immobilisiertem Fibrinmonomer nicht adsorbierbaren (I) und der adsorbierbaren (II) Unterfraktion von Fragment D im Vergleich mit der D-Gesamtfraction (III) und Fibrinogen (IV)

7.5 %ige Gele, 8 Std.; Proben nach DTE-Reduktion

Das zweite Endprodukt der Plasminolyse neben Fragment D, das Fragment E, besteht im wesentlichen aus dem N-terminalen Disulfid-Knoten von Fibrinogen ("EINFÜHRUNG", vgl. Abschnitt II.1.4). Es besitzt keinerlei Affinität zu Fibrinmonomer, wie Abb. 20 verdeutlicht hat. Nach Angaben von York und Blomback (46) kann Fragment E in Gegenwart von Thrombin so "aktiviert" werden, daß es an immobilisiertem Fibrinmonomer adsorbiert werden kann. Die Abspaltung der Fibrinopeptide führt zur

Freilegung einer Haftstelle, die der in der D_{γ} -Kette vorhandenen komplementär ist.

Fragment Y zeigt eine beträchtliche, wenn auch schwächere Wechselwirkung mit Fibrinmonomer als intaktes Normalfibrinogen. Aufgrund seiner unsymmetrischen Struktur ($D + E = Y$) liegt sein chromatographisches Verhalten zwischen dem von Fragment D und E. Solange dem Bruchstück einseitig noch die vollständige γ -Kette erhalten ist, dürfte es noch die Affinität zu Fibrinmonomer aufweisen. Innerhalb der Y-Fraktion treten jedoch offensichtlich Fragmente auf, denen dieses Stück der γ -Kette fehlt und die somit nicht mehr adsorbierbar sind. Aufgrund eines strukturellen Vergleiches von Fragment Y und Fragment D, sowie Befunden von Hörmann und Henschen (148) sollten die Unterschiede im C-terminalen Bereich der γ -Kette liegen.

Fragment X weist in diesen Untersuchungen ein dem Normalfibrinogen analoges Affinitätsverhalten gegenüber Fibrinmonomer auf. Es kann, seiner symmetrischen Struktur ($D + E + D + X$) gemäß, bis zu zwei Haftstellen zu Fibrinmonomer besitzen. Daneben dürften jedoch Anteile vorliegen, denen die Haftstelle in der γ -Kette beidseitig, oder zumindest einseitig, fehlt. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens von Fragment D scheint zur Interaktion mit immobilisiertem Fibrinmonomer nur eine Haftstelle im Molekül erforderlich.

III. Zur Wechselwirkung von Fibrinogen und Fibrinmonomer mit Kollagen

In diesem Abschnitt wird erstmals über Experimente berichtet, die auf eine beträchtliche Wechselwirkung von Fibrinogen und Fibrinmonomer mit verschiedenen Kollagentypen schließen lassen.

1. Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen verschiedenen Typs

Die Interaktion wird anhand des chromatographischen Verhaltens verschiedener Fibrinogen- bzw. Fibrinmonomer-haltiger Präparate an immobilisiertem Kollagen aus Kalbshaut vom Typ I-nativ, Typ I-denaturiert und Typ III-nativ aufgezeigt.

1.1 Plasma ohne Thrombininkubation

Humanes Citratplasma (jeweils 3 ml) wurde an den drei Kollagen-Sepharosetypen bei 4 °C adsorbiert (Säule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 21 ml / Std.; nicht adsorbierbares Material = Fraktion A). Desorbiert wurde zweistufig: zunächst bei 37 °C unter physiologischen Pufferbedingungen (Fraktion B) und anschließend bei 4 °C mit 1M KBr (Fraktion C). Nahezu das gesamte adsorbierbare Material wurde als Fraktion B erhalten, während mit Bromid-haltigem Puffer nur mehr eine mengenmäßig sehr geringe Fraktion C eluiert wurde. Die B- und C-Fractionen aus den drei Experimenten wurden mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Die elektrophoretischen Trennbilder der erhaltenen B-Fractionen aus der Affinitätschromatographie von Plasma an immobilisiertem Kollagen sind in Abb. 22 gegenübergestellt.

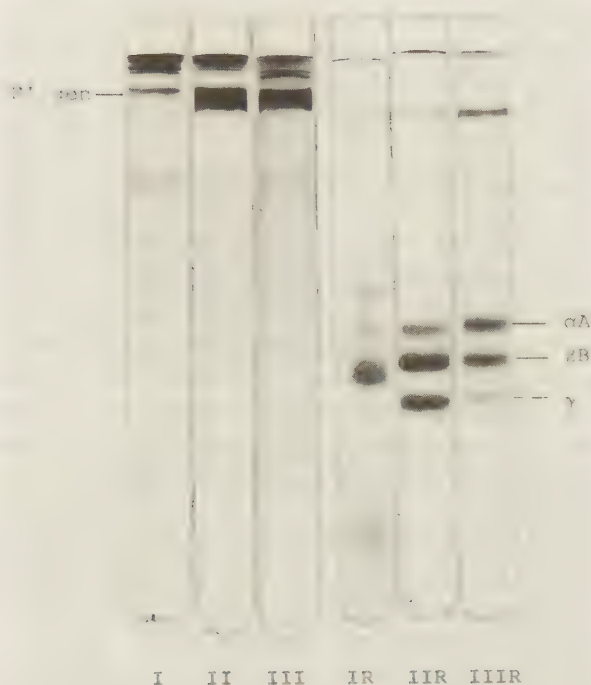


Abb. 22 SDS-Gelelektrophorese der B-Fractionen aus der Affinitätschromatographie von Plasma an immobilisiertem Kollagen

I : Plasma adsorbiert an Kollagen Typ I-nativ
 II : Plasma adsorbiert an Kollagen Typ I-denaturiert
 III: Plasma adsorbiert an Kollagen Typ III-nativ
 5 %ige Gele, 10 Std.; R = Proben nach DTE-Reduktion

Die Fraktion B, desorbiert von immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert (II) und von immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ (III), enthielt fibrinogenes Material, das besonders nach DTE-Reduktion (IIR und IIIR) aufgrund seiner drei Untereinheiten gut im Bandenmuster der SDS-Gelelektrophorese zu erkennen war. Die entsprechende Fraktion B von immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ zeigte nach DTE-Reduktion

keine Fibrinogen-Einzelketten (IR). Alle B-Fraktionen wiesen eine schwache Bande im Bereich der Mobilität von Immunglobulinen (möglicherweise Komplementfaktor Clq ?!) sowie von CIG auf. In den mit 1M KBr eluierten C-Fraktionen (Trennbilder nicht dargestellt) war lediglich wenig CIG enthalten.

1.2 Plasma nach limitierter Thrombininkubation

Fibrinmonomer neigt unter physiologischen Pufferbedingungen zur Aggregation und würde sofort unlöslich werden. In Gegenwart von einem Überschuß von Fibrinogen gelingt es jedoch, an sich unlösliches Fibrinmonomer in Lösung zu halten. Unter den Bedingungen der limitierten Thrombininkubation werden nach Angaben von Shainoff und Page (26) nur etwa 10 - 15 % des Plasmafibrinogens in Fibrinmonomere übergeführt, wobei das Restfibrinogen deren Ausfallen verhindert.

Dazu wurde humanes Citratplasma mit 0.1 NIH Thrombin per ml 20 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 USP-Einheiten Heparin per ml gestoppt und die Plasmaproben (jeweils 3 ml) an den drei Kollagen-Sepharosetypen bei 4 °C chromatographiert (Saule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 2l ml / Std.). Die Elution erfolgte mit 1M KBr bei 4 °C einstufig ohne vorgeschalteten Wärmeschritt. Die dabei erhaltenen C-Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht, gefärbt und das Bandenmuster photooptisch bei 620 nm mit einem automatischen Gel-scanner (Chromoscan, Joyce-Loebl Comp., Gateshead) ausgewertet.

In Abb. 23 werden die an Kollagen Typ I-nativ erhaltenen C-Fraktionen aus Plasma mit und ohne limitierter Thrombinbehandlung verglichen (Scandiagramme nach SDS-Gelelektrophorese).

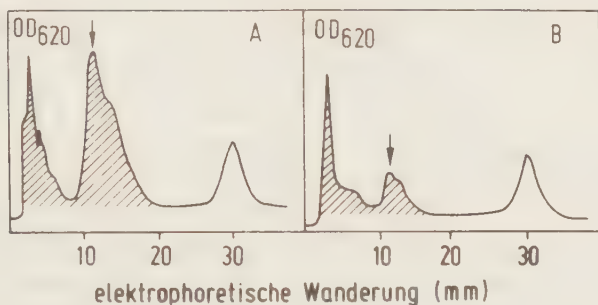


Abb. 23 SDS-Gelelektrophorese der C-Fractionen aus der Affinitätschromatographie von Plasma an immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ (Scandiagramme)

A: Plasma mit limitierter Thrombin-Inkubation

B: Plasma ohne limitierte Thrombin-Inkubation

5 %ige Gele, 10 Std.; Proben nicht DTE-reduziert

Die erhaltenen Bandenmuster bestanden in beiden Fällen aus drei Hauptbanden, wobei die Mobilität der mittleren Bande (Pfeil) der von Fibrinogen bzw. Fibrinmonomer entsprach. Sie zeigte im Diagramm der C-Fraktion aus Plasma mit limitierter Thrombininkubation (Abb. 23, A) eine wesentlich stärkere Intensität als in der entsprechenden Fraktion ohne Thrombininkubation (B). Es wurde also bei der Adsorption von Plasma nach Thrombininkubation mehr Material mit einem elektrophoretischen Verhalten von Fibrinogen / Fibrinmonomer gebunden als ohne, was daraufhinweist, daß Kollagen Typ I-nativ bevorzugt Fibrinmonomere zu binden vermag. Untersuchungen der C-Fractionen von Thrombin-behandeltem Plasma an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert und Typ III-nativ in der SDS-Gelelektrophorese (nicht dargestellt) ergaben ähnliche Trennbilder mit deutlichen Banden im Fibrinogen- bzw. Fibrinmonomerbereich.

An immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert und Typ III-nativ wird aus Plasma sowohl Fibrinogen als auch Fibrinmonomer zurückgehalten, hingegen besitzt immobilisiertes

Kollagen Typ I-nativ kaum Affinität zu Plasmafibrinogen, wohl aber zu Fibrinmonomeren.

1.3 Gereinigtes Fibrinogen

Mit der Chromatographie von Reinfibrinogen (Gerinnbarkeit 90 %) an immobilisiertem Kollagen sollten die Befunde der Affinitätschromatographie von Plasma überprüft und ihre quantitative Seite bearbeitet werden.

Dazu wurde auf drei gleich großen Säulen (0.8 x 20 cm) im gleichen Volumen (2 ml) die gleiche Fibrinogenmenge (5 mg) aufgebracht und mit der gleichen Durchlaufrate (21 ml / Std.) jeweils gleich lang eluiert. Die Elution erfolgte nach dem Auftragen zunächst mit Auftragspuffer bei 4 °C (nicht adsorbierbarer Anteil) bis sich eine klare Grundlinie eingestellt hatte, anschließend mit einem kontinuierlichen KBr-Gradienten ebenfalls bei 4 °C (adsorbierbarer Anteil). In erster Näherung wurde angenommen, daß das Säulenmaterial etwa gleich stark mit den einzelnen Kollagentypen beladen war. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme ist in Tab. 9 zusammengefaßt.

immobilisierter Kollagentyp	nicht adsorbierbarer Anteil (%)	adsorbierbarer Anteil (%)
Typ I-nativ	88	12
Typ I-denaturiert	10	90
Typ III-nativ	7	93

Tabelle 9 Affinitätschromatographie von gereinigtem Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen (quantitative Auswertung)

Säule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 21 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 5 mg Fibrinogen in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M KBr, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 4 °C; Desorption: linearer KBr-Gradient (0.1M gegen 1M), bei 4 °C. Immobilisiertes Kollagen Typ III-denaturiert wurde aufgrund seiner großen Renaturierungstendenz nicht als Affinitätsmaterial untersucht. Die Prozentangaben wurden durch Planimetrieren der Peakflächen des Chromatogramms berechnet.

Immobilisiertes Kollagen Typ I-nativ ist praktisch nicht in der Lage, Fibrinogen zu binden. Immobilisiertes Kollagen Typ I-denaturiert und Typ III-nativ besitzen beide eine vergleichbare Affinität zu Fibrinogen. Damit werden die Befunde aus der Affinitätschromatographie von Plasmafibrinogen bestätigt.

1.4 Eingrenzung der Haftstelle von Fibrinogen zu Kollagen

Im vorhergehenden Abschnitt war über eine etwa gleich starke Affinität der beiden Kollagentypen I-denaturiert und III-nativ berichtet worden. Auch hier stellt sich, wie im Falle der Affinität von Fibrinogen zu Fibrinmonomer, die Frage nach der Lage der den Haftstellen im Molekül und wie weit sie mit denen zu Fibrinmonomer übereinstimmen. Ähnlich wie dort sollten Fibrinogenfragmente, die die Haftregion für Kollagen noch enthalten, vom Säulenmaterial zurückgehalten werden. Diejenigen Fibrinogenbruchstücke, bei denen sie bereits abgespalten ist, sollten zur Bindung an immobilisiertes Kollagen nicht mehr befähigt sein. Die folgenden Versuche wurden an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ durchgeführt, da dieser sich als besonders Fibrinogen-affin erwiesen hatte.

Zunächst wurde ein nach 10 Minuten Plasminolyse und nach 30 Minuten Plasminolyse erhaltenes Abbaugemisch von Fibrinogen ("EXPERIMENTELLER TEIL" vgl. Abschnitt VI.2.1) sowie Fibrinogen zum Zeitpunkt 0 Minuten des Abbaues an Kollagen-Sepharose bei 4 °C chromatographiert. Das zurückgehaltene Material wurde bei 4 °C mit 1M KBr einstufig desorbiert. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme ist in Tab. 10 zusammengefaßt.

Plasminolysedauer (min)	nicht adsorbierbare Anteile (%)	adsorbierbare Anteile (%)
0	7	93
10	70	30
30	95	5

Tabelle 10 Affinitätschromatographie von Plasminolyse-Gemischen verschiedenen Abbaugrades von Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ (quantitative Auswertung)

Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 21 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 8 mg Protein in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 4 °C; Desorption: einstufig mit 0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C. Die Prozentangaben wurden durch Planimetrieren der Peakflächen des Chromatogramms berechnet.

Wie zu erwarten war, nahm der Anteil von nicht adsorbierbaren Fragmenten im Zuge der Plasminolyse zu. Ein besonders hoher Verlust an Kollagen-affinem Material wurde in den ersten 10 Minuten des Abbaus beobachtet, in denen hauptsächlich die Fragmente X und Y entstehen. Nach 30 Minuten Abbau war praktisch kein Bestandteil mehr zur Bindung an das Säulenmaterial befähigt.

Aus dem chromatographischen Verhalten des mit Plasmin erhaltenen Abbaugemisches von Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ ist zu schließen, daß die Haftregion von Fibrinogen zu Kollagen bereits in den anfänglichen Stadien der Plasminolyse abgespalten wird. Die folgenden Untersuchungen an isolierten Fibrinogenbruchstücken sollten diese Befunde verdeutlichen und die Lage der Haftstelle zu Kollagen eingrenzen. Aufgetragen wurde bei 4 °C, eluiert wurde mit 1M KBr ebenfalls bei 4 °C. Alle Experimente wurden unter vergleichbaren chromatographischen Bedingungen durchgeführt. Abb. 24 zeigt das chromatographische Verhalten einiger isolierter Fibrinogenfragmente an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ.

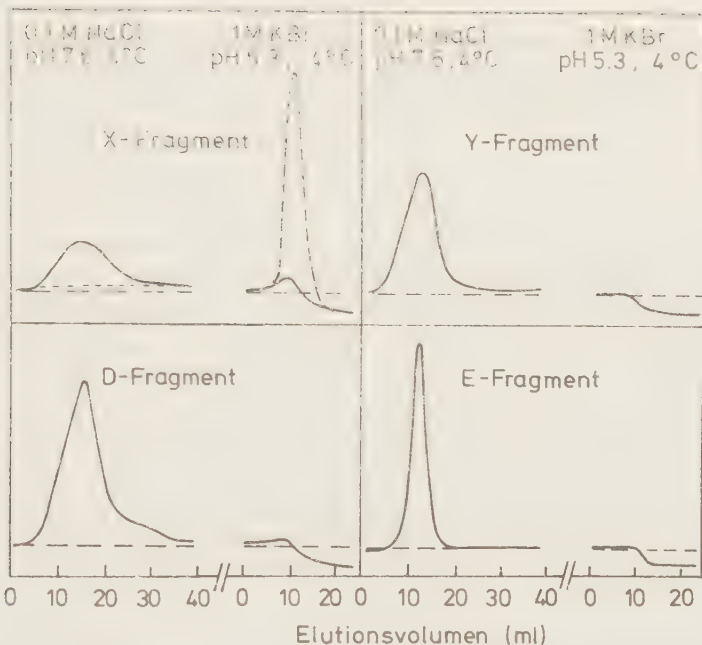


Abb. 24 Affinitätschromatographie von Fibrinogen-Spaltprodukten an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ. -----: Fibrinogen als Vergleich.

Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 21 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 5 mg Protein in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, 4 °C; Desorption: einstufig mit 0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, 4 °C (Fraktion C)

Außer intaktem Fibrinogen wurde keines seiner Fragmente in vergleichbarem Maße an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ zurückgehalten. Von der untersuchten X-Fraktion war nur ein geringer Anteil zur Bindung an das Säulenmaterial befähigt, von den Fragmenten Y, D und E wurde nichts adsorbiert. Für die bei 4 °C unter physiologischen Bedingungen nicht gebundene Fraktion ergab sich als Elutionsprofil im Fall des X-Fragmentes ein ziemlich breiter Gipfel, was auf eine schwache Wechselwirkung hinwies. Im Falle des Y- und des D-Fragmentes spitzte sich das Profil zu und nahm beim E-Fragment eine schmale hohe Form an.

Das Bindevermögen von Fibrinogen zu Kollagen Typ III-nativ geht also beim Übergang zu X-Fragment bereits zum größten Teil verloren. Die Wechselwirkung der späteren Fragmente mit dem Säulenmaterial nimmt noch geringfügig von X nach E ab.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß die wesentliche Haftstelle für Kollagen in den äußeren Bereichen der α -Ketten des Fibrinogen-Moleküls lokalisiert ist. Aus diesem Grund wurde ein Bromcyan-Bruchstück von Fibrinogen, das aus diesen äußeren Teilen stammt, das sog. FCB - 3 ($MW\ 4.5 \times 10^4$), unter vergleichbaren Bedingungen chromatographiert. Abb. 25 zeigt sein chromatographisches Verhalten an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ. Im Vergleich ist nochmals das erhaltene Elutionsprofil des E-Fragmentes dargestellt, da dieses Plasminbruchstück in seiner Größe ($MW\ 5 \times 10^4$) etwa dem Bromcyan-peptid entspricht.

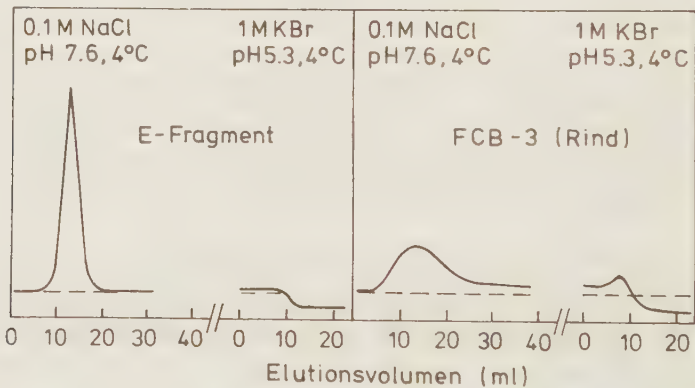


Abb. 25 Affinitätschromatographie von Fragment E und FCB-3 an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ
Chromatographische Bedingungen siehe Legende zu Abb. 24

Auch von FCB-3 wurde nur ein geringer Anteil an der Säule adsorbiert und mit 1M KBr anschließend eluiert. Der verbreiterte Gipfel des adsorbierten Materials zeugte jedoch von einer deutlichen Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial.

Fragment E, das als spitzer, schmaler Gipfel eluierte, schien zu einer solchen Wechselwirkung, obwohl vom Molegewicht vergleichbar, nicht befähigt zu sein.

Ähnliche Untersuchungen wurden an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert durchgeführt und ergaben übereinstimmende Ergebnisse zu den obig angeführten Experimenten. Sie sind gute Evidenz dafür, daß Fibrinogen im wesentlichen über äußere leicht abspaltbare Teile des Moleküls an Kollagen adsorbiert wird. Haftstellen im Inneren des Moleküls kommen bei dieser Wechselwirkung offensichtlich nicht zum Tragen.

1.5 Vergleich der Affinität Fibrinogen / Kollagen und Fibrinogen / Fibrinmonomer

Es wurde das chromatographische Verhalten von Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ dem an immobilisiertem Fibrinmonomer gegenübergestellt. Dazu wurde in einem Parallelversuch bei 4 °C jeweils die gleiche Menge Fibrinogen (5 mg) im gleichen Volumen (2 ml) auf die jeweiligen Affinitätssäulen der gleichen Dimension (0.8 x 20 cm) bei gleicher Durchflußrate (21 ml / Std.) aufgebracht. Das zurückgehaltene Material wurde in einem kontinuierlichen KBr-Gradienten bei 4 °C desorbiert. In Abb. 26 sind die erhaltenen Elutionsprofile dargestellt.

Fibrinogen wurde an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ bereits in den Anfängen des Gradienten desorbiert, von immobilisiertem Fibrinmonomer erfolgte die Ablösung erst bei wesentlich höheren KBr-Konzentrationen. Die Affinitätschromatographie von Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert (nicht dargestellt) ergab ein dem Typ III-nativ völlig analoges Elutionsprofil. Immobilisiertes Kollagen Typ I-nativ besitzt, wie aus Abb. 22 und Tab. 9 hervorgeht, keine Affinität zu Fibrinogen.

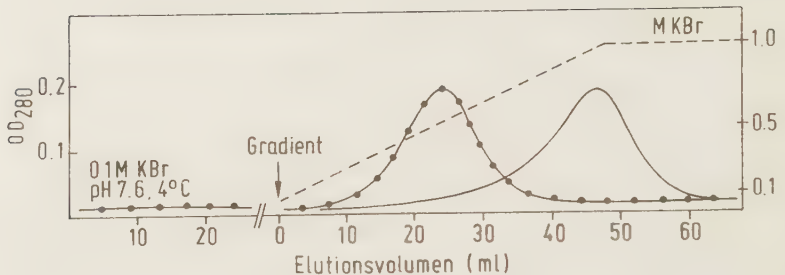


Abb. 26 Affinitätschromatographie von Fibrinogen an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ (●-●-●) und an immobilisiertem Fibrinmonomer (—)

Säule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 21 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 5 mg Fibrinogen in 2 ml 0.05M Tris, 0.1M KBr, 0.025M EACA, pH 7.6, 4 °C; Elution: linearer KBr-Gradient (0.1M gegen 1M), 4 °C.

Die Wechselwirkung von Fibrinogen zu Kollagen Typ III-nativ und Typ I-denaturiert ist demnach schwächer als die zu Fibrinmonomer. Experimente zur Adsorption von Plasma an immobilisiertem Kollagen (vgl. Abschnitt III.1.1) wiesen darauf hin, daß in dieser Versuchsanordnung die Affinität beider Komponenten nur bei 4 °C beobachtet wird. Die Desorption bei 37 °C unter physiologischen Pufferbedingungen hatte dort zur vollständigen Ablösung des zurückgehaltenen Plasmafibrinogens geführt. In der mit 1M KBr bei 4 °C erhaltenen, mengenmäßig geringen Fraktion fand sich noch etwas CIG, das eine stärkere Affinität zu Kollagen aufzuweisen scheint (vgl. dazu Abschnitt VI.2).

1.6 Präparative Reinigung von Fibrinogenfraktionen

In Abschnitt III.1.2 und 3 war beobachtet worden, daß Fibrinogen von immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ nur wenig gebunden wird, wohl aber Fibrinmonomer und CIG. Dieser Umstand wird im folgenden zu einer neuartigen Trennung von Fibrinogen einerseits und CIG / Fibrinmonomer andererseits präparativ genutzt.

Zur Aufarbeitung wurde der stark fibrinogenhaltige Niederschlag herangezogen, der im Zuge der Aufarbeitung von Plasma auf CIG im letzten Glycinfällungsschritt in präparativen Mengen anfällt (vgl. dazu Abschnitt IV.1). Diese Fraktion enthält, wie einige andere aus dem Fällungsgang, Anteile von Fibrinogen, Fibrinmonomer und CIG, jedoch keine anderen Proteine wie Albumin oder Immunglobuline. Die Fraktion wurde an einer Säule von immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ (2.5 x 30 cm, Durchfluß: 90 ml / Std.) bei 4 °C chromatographiert, wobei das nicht adsorbierte Material gesammelt wurde. Es enthielt CIG-freies Fibrinogen einer Gerinnbarkeit von mindestens 90 %. Anschließend wurde mit 1M KBr bei 4 °C eine im wesentlichen aus Fibrinmonomeren und CIG bestehende Proteinfraction (Gerinnbarkeit unter 40 %) eluiert, die nach Dialyse zur Verbesserung der Ausbeute weiter auf CIG aufgearbeitet werden konnte.

IV. Reindarstellung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG)

In den Versuchen zur Fraktionierung von Plasmafibrinogen an DEAE-Cellulose waren bereits Hinweise auf eine Eignung des dort verwendeten Stufengradientensystems (vgl. Abschnitt I.1) zur Endreinigung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) erhalten worden. In den späteren Fraktionen trat CIG dort bereits in relativ reiner Form auf. Zu seiner präparativen Reindarstellung war es jedoch erforderlich, zunächst angereicherte Plasmafraktionen herzustellen. Deren chromatographische Endreinigung sollte dann an DEAE-Cellulose unter Einsatz des abgestuften Gradienten in einer vereinfachten Form erfolgen.

1. Gewinnung angereicherter CIG-Fractionen

Zunächst soll ein Aufarbeitungsschema mittels fraktionierter Fällung von Plasma in Anlehnung an die von Moseson und Umfleet (77) und Chen und Moseson (125) erarbeitete Methode beschrieben werden. Im Anschluß wird über ein neuartiges, wesentlich vereinfachtes Anreicherungsverfahren berichtet,

das nach Kenntnis der Affinitätsbeziehungen von CIG zu Kollagen selbst entwickelt wurde.

Bei der ersten Anreicherungsmethode wurde Plasma durch Zugabe von pulverisiertem Glycin bis zu einer Endkonzentration von 2.1M bei 4 °C gefällt. Der erhaltene Niederschlag (Fraktion I-0) wurde in 0.055M Natriumcitrat pH 6.35 gelöst und mehrfach dagegen dialysiert. Danach wurde auf eine Proteinkonzentration von 0.67 % verdünnt und durch Zugabe von 2 % Äthanol und 0.12M Glycin bei 0 °C als Niederschlag Fraktion I-1 gefällt. Dieser Niederschlag wurde bei Raumtemperatur in 0.25M Tris-Phosphat pH 7.0 gelöst und auf ein Achtel des ursprünglichen Plasmavolumens gebracht. Es folgte eine weitere Glycinfällung (Endkonzentration 2.1M) bei 15 °C, wobei fibrinogenes Material weitgehend als Niederschlag abgetrennt wurde, während Roh-CIG im Überstand verblieb.

In Abb. 27 ist die SDS-Gelelektrophorese des Überstandes und des Niederschlages beim letzten Glycinfällungsschritt dargestellt. Die Glycinfällung wurde nicht, wie in der Originalarbeit beschrieben, zunächst bei 4 °C mit langsamem Erwärmen auf 15 °C, sondern gleich bei dieser Temperatur durchgeführt. Bei tiefer Temperatur wird CIG von gefällttem Fibrinmonomer adsorbiert, so daß eine effektive Abtrennung von fibrinogenem Material erst bei höherer Temperatur gewährleistet ist. Auf die zusätzlich angegebene Äthanolfällung im Anschluß an die Glycinfällung bei 15 °C wurde im Hinblick auf Ausbeuteverluste und Gefahr der Denaturierung verzichtet.

Mit dieser modifizierten Methode wurden aus 5 Litern Humanplasma etwa 200 - 230 mg Roh-CIG gewonnen, das nach Dialyse gegen 0.039M Tris-Phosphat, pH 8.6, zur Endreinigung an DEAE-Cellulose chromatographiert wurde (vgl. Abschnitt IV.2). Der Niederschlag wurde mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, extrahiert und auf eine präparative Säule mit immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ gebracht. Das nicht adsorbierte Material bestand aus elektrophoretisch einheitlichem Fibrinogen hoher Gerinnbarkeit (vgl. Abschnitt III.1.6). Daneben wurde ein Anreicherungsverfahren, das die Affinität von CIG zu Kollagen präparativ nutzt, neu entwickelt.

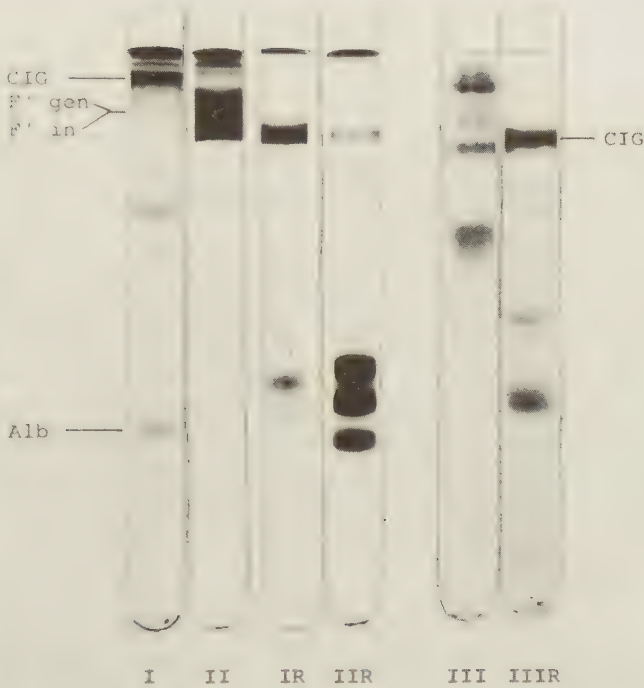


Abb. 27 Zur Anreicherung von CIG aus Plasma. SDS-Gel-elektrophorese von Fraktionen, erhalten durch fraktionierte Fällung (I und II) und durch Affinitätschromatographie (III)

- I : Überstand aus dem letzten Glycin-Fällungsschritt (2.1M, 15 °C)
 II : Niederschlag aus dem letzten Glycin-Fällungsschritt (2.1M, 15 °C)
 III: Fraktion C aus der Affinitätschromatographie des Glycin-Niederschlages (1.5M, 15 °C) von Plasma an immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ (einstufige Elution)
 5 %ige Gele, 10 Std.; R = Proben nach DTE-Reduktion

Dazu wurde 1 Liter Humanplasma mit Glycin bei 15 °C bis zu einer Endkonzentration von 1.5M versetzt und 2 Stunden bei derselben Temperatur gerührt. Die Fällungsbindungen sind so gewählt, daß CIG komplett, jedoch nur ein relativ geringer Teil des Plasmafibrinogens ausfällt. Der Niederschlag wird in etwa einem Fünftel des ursprünglichen Plasmavolumens an 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, gelöst und an immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ bei 4 °C chromatographiert (Säule: 2.5 x 35 cm; Durchfluß: 35 ml / Std.). Die mit 1M KBr nach Passage nicht adsorbierten Materials erhaltene Fraktion C (einstufige Desorption) wurde gegen 0.039M Tris-Phosphat, pH 8.6, dialysiert und zur Endreinigung bei Raumtemperatur an DEAE-Cellulose chromatographiert.

Sie ergab nach SDS-Gelelektrophorese die in Abb. 27 (III und IIIR) dargestellten Bandenmuster. Mit dieser vereinfachten Methode der Anreicherung wurden aus einem Liter Humanplasma etwa 200 - 250 mg Roh-CIG-Fraktion erhalten. Ihre elektrophoretische Reinheit war vergleichbar mit der der Roh-CIG-Fraktion, die auf dem klassischen Wege der fraktionierten Fällung aus Plasma angereichert worden war. Bei letzterer lag jedoch die Ausbeute um den Faktor 4 - 5 niedriger.

2. Endreinigung

Die durch fraktionierte Fällung oder mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ angereicherten CIG-Rohfraktionen wurden durch Chromatographie an DEAE-Cellulose in einem ähnlichen Stufengradienten, wie er zur Fraktionierung von Plasmafibrinogen verwendet worden war (vgl. Abschnitt I. 1), vollständig gereinigt. An dortiger Stelle war der Anfangsbereich des Gradienten bewußt stark gespreizt worden, um die Überlagerung von Normalfibrinogen mit partiell abgebauten Fibrinogenen zu verhindern. Bei der präparativen Endreinigung von angereicherten CIG-Rohfraktionen wurden die Pufferstufen p_2 und p_5 zu einer Stufe zusammengefaßt, da CIG erst zum Ende des Gradienten eluiert wird. In Tab. 11 sind die zur Elution verwendeten Pufferstufen, deren Molarität und pH-Wert angeführt.

Pufferstufe	Mischung aus			pH
	O.039M Tris-PO ₄	+ 0.5M Tris-PO ₄	Tris	
	pH 8.6 (Volumina)	pH 4.2 (Volumina)	(M/l)	
p ₁	49.5	-. -	0.039	8.6
p ₅	40.0	9.5	0.127	6.2
p ₆	30.0	19.5	0.220	5.3

Tabelle 11 Zusammensetzung des abgestuften Gradienten zur
Endreinigung von CIG an DEAE-Cellulose

Chromatographiert wurde an einer 2.5 x 35 cm großen Säule bei einem Durchfluß von etwa 80 ml / Std. bei Raumtemperatur. Das angereicherte Material wurde in 0.039M Tris-PO₄, pH 8.6, auf die Säule gebracht, und gleich mit 0.127M Tris-PO₄, pH 6.2, Fraktion p₅ erhalten. Nachdem die Säule gründlich mit dieser Pufferstufe äquilibriert worden war (Durchströmen über Nacht!), wurde mit 0.220M Tris-PO₄, pH 5.3, als Fraktion p₆ reines CIG desorbiert.

In Abb. 28 sind die elektrophoretischen Trennbilder der einzelnen DEAE-Fractionen nach SDS-Gelelektrophorese mit dem Ausgangsmaterial verglichen. Die p₆-Fraktion (III und IIIR) enthielt das gereinigte, zumindest im reduzierten Zustand elektrophoretisch einheitlich wandernde Kälte-unlösliche Globulin (CIG). Dieses Material ergab sowohl in der Geldiffusion nach Ouchterlony als auch in der Immunelektrophorese gegen Anti-Human-Gesamtserum nur eine Präzipitationslinie bzw. einen Präzipitationsbogen. Für das durch fraktionierte Fällung gewonnene Roh-CIG führte die einmalige Chromatographie zum gereinigten Protein, für das durch Affinitätschromatographie erhaltene Material war zur vollständigen Entfernung von CIG-Abbauprodukten gelegentlich eine Rechromatographie im gleichen System erforderlich. Im Regelfall ließen sich die im Ausgangsmaterial enthaltenen Verunreinigungen (Immunglobuline, Restfibrinogen bzw. -Fibrinmonomer und Albumin) quantitativ als Vorfraktion (II und IIR) abtrennen. Im Anschluß an die

Elution von Fraktion p_6 wurden mit einem Puffer höherer Ionenstärke und niedrigerem pH-Wertes nur Kleinstmengen an CIG als Fraktion p_7 erhalten. Es wurde daher auf eine weitere Elution unter diesen Bedingungen verzichtet.



Abb. 28 Zur Endreinigung von CIG. SDS-Gelelektrophorese von Fraktionen, erhalten durch DEAE-Chromatographie von angereicherten CIG-Präparaten

I : CIG-Rohfraktion, erhalten durch fraktionierte Fällung, Gesamtmaterial

II : p_5 -Fraktion

III: p_6 -Fraktion

5 %ige Gele, 10 Std.; R = Proben nach DTE-Reduktion

Die mit Pufferstufe p_7 erscheinende, mengenmäßig sehr kleine Fraktion wurde nicht berücksichtigt.

Die Ausbeute an gereinigtem CIG lag für die auf dem Wege der fraktionierten Fällung gewonnenen Präparate etwa bei 12 - 15 %, bezogen auf einen Plasmagehalt von 0.3 mg / ml. Für das durch Affinitätschromatographie erhaltene Rein-CIG lag sie bei etwa 60 %, also um den Faktor 4 - 5 höher als bei der, zudem sehr langwierigen, Fällungsmethode.

3. Charakterisierung von CIG

Natives CIG erschien bei Molekularsiebchromatographie an Biogel A-1.5M in 0.2M Phosphat, pH 7.2 (nicht dargestellt) kurz hinter dem Ausschlußvolumen der Säule. Untersuchungen mittels SDS-Gelelektrophorese lieferten ein Trennbild mit einer dem Molekulargewicht von etwa 4.4×10^5 entsprechende Hauptbande und eine Reihe langsam wandernder Oberbanden. Nach DTE-Reduktion wurde eine einzige Bande im Molekulargewichtsbereich von 2.2×10^5 festgestellt (vgl. Abb. 28 III und IIIR). Offensichtlich neigt reines CIG unter physiologischen Bedingungen zur Bildung disulfidvernetzter Oligomere, die sich unter reduktiven Bedingungen in die Monomeren überführen lassen.

3.1 Vollständige Reduktion in Gegenwart von Harnstoff

CIG wurde vollständig reduziert und anschließend carboximethyliert ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.1.1 und 1.4). Die CM-CIG-Untereinheit wurde an CM-Cellulose in einem kontinuierlichen Natriumacetat-Gradienten bei pH 5.3 in Gegenwart von 8M Harnstoff chromatographiert. Das erhaltene Elutionsprofil ist in Abb. 29 dargestellt.

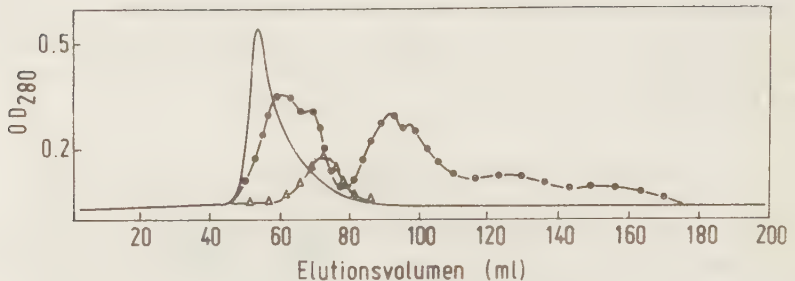


Abb. 29 Chromatographie der reduzierten und carboxymethylierten CIG-Untereinheit (—) an CM-Cellulose

Zum Vergleich: ●-●-●: CM-Fibrinogen, vollständig reduziert;
Δ-Δ-Δ: CM-Albumin, vollständig reduziert.
Säule: 0.8 x 25 cm; Durchfluß: 12.6 ml / Std.; aufgetragen:
jeweils 25 mg CM-Protein in 5 ml Startpuffer; Elution: linearer
Natriumacetat-Gradient (0.005M gegen 0.1M) in 8M Harnstoff.

Die CM-CIG-Untereinheiten (—) chromatographierten in diesem Gradienten etwas vor dem CM-Albumin (Δ-Δ-Δ) und an vergleichbarer Stelle wie die CM- γ -Kette von Fibrinogen (●-●-●). Mit dem erhaltenen Material wurden Aminosäureanalysen und vergleichende immunologische Untersuchungen durchgeführt.

3.2 Aminosäurezusammensetzung

In Tab. 12 sind die Werte aus der Aminosäureanalyse von CIG bzw. seiner Untereinheiten zusammengestellt.

Aminosäure	CM-CIG	CIG
Cys ⁺	3.8	-
Asp	9.5	10.2
Ser	10.0	10.7
Thr	8.8	8.0
Glu	15.3	15.8
Pro	5.0	4.8
Gly	9.1	8.5
Ala	5.1	5.5
Val	7.7	8.1
Met	1.0	1.1
Ileu	4.1	4.5
Leu	5.3	6.7
Tyr	3.7	3.7
Phe	2.1	2.2
His	2.1	1.9
Lys	3.0	3.5
Arg	4.4	4.8

⁺ analysiert als carboximethyliertes Cystein

Tabelle 12 Aminosäurezusammensetzung von CIG bestimmt an der reduziert-carboximethylierten Untereinheit (1. Spalte) und am nicht reduzierten Protein (2. Spalte)

Angaben in Mol pro 100 Mol Aminosäuren; Tryptophan nicht berücksichtigt;

Im CIG wurde, wie sein chromatographisches Verhalten an Ionenaustauschern erwarten ließ, ein hoher Anteil an sauren Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure), außerdem noch von Threonin und Serin gefunden. Übereinstimmend damit war bei der Endreinigung von CIG an DEAE-Cellulose das gereinigte Protein erst bei hoher Ionenstärke und niedrigem pH-Wert erschienen. Die in Tab. 12 zusammengestellten Aminosäuredaten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Werten von Mosesson und Umfleet (77).

V. Zur Struktur von CIG

Die wenigen, bislang zur Struktur von CIG bekannten Fakten beziehen sich auf den Kohlenhydrat-Gehalt, auf einige Daten aus physikalisch-chemischen Messungen mittels Ultrazentrifuge und Cirkulardichroismus und vor allem auf die Reduzierbarkeit durch DTE, wobei zwei identische Untereinheiten vom Molgewicht 2.2×10^5 entstehen (vgl. auch Abschnitt IV.2 und 3).

An dieser Stelle wird erstmals über die Lage der interchainaren Disulfid-Bindungen, über die Eingrenzung der gegenüber Gerinnungsfaktor XIII_a sensitiven Region und über Natur und Verteilung antigener Determinanten im nativen Molekül berichtet. Die angeführten Ergebnisse sind aus Fragmentierungsexperimenten hervorgegangen und haben die Basis für die später behandelte biologische Seite des Problemkreises geschaffen./

1. Einbau von ^{14}C -Putrescin

Wie eingangs erwähnt ist CIG als Substrat für aktivierten Gerinnungsfaktor XIII (F XIII_a), einer hochspezifischen Plasma-Transglutaminase, erkannt worden (78). In Abwesenheit eines geeigneten primären Amins, führt die durch F XIII_a katalysierte Transamidierungsreaktion zu einer kovalenten Ankopplung des Liganden an CIG. Damit ist die Möglichkeit gegeben, unter Verwendung eines radioaktiven Amins, beispielsweise ^{14}C -Putrescin, die Bindungsstelle von CIG zu markieren. Anhand der proteingebundenen Radioaktivität kann so die Anzahl der zur Transamidierungsreaktion befähigten Glutaminreste bestimmt werden.

Dazu wurden $70 \mu\text{g}$ ^{14}C -Putrescin-Dihydrochlorid (NEN-Chemicals, Dreieichenhain) mit einer spezifischen Aktivität von $1.39 \text{ mCi} / \text{mg}$ und 25 Einheiten Gerinnungsfaktor XIII (Faktor XIII-Konzentrat, Behringwerke AG, Marburg) zu 25 ml einer CIG-Lösung der Konzentration $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ in 0.1 M HEPES, 0.1 M NaCl, pH 7.4, die 2 mM Cysteinhydrochlorid und 2 mM CaCl_2

enthielt, gegeben. Nach Aktivierung des F XIII durch 30 NIH Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke AG, Marburg) in 0.3 ml HEPES / NaCl, pH 7.4, wurde die Mischung 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der proteingebundenen ^{14}C -Radioaktivität wurden 40 μg ^{14}C -Putrescin-CIG nach DTE-Reduktion der SDS-Gelelektrophorese in 5 %igem Gel für 10 Std. unterworfen und die Bande im Molekulargewichtsbereich von 2.2×10^5 ausgewertet ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt IV.3). Für die später beschriebenen Fragmentierungsexperimente wurde das Material zur Abtrennung eingeschleppter Begleitproteine und überschüssigem ^{14}C -Putrescin in dem zur Endreinigung verwendeten DEAE-Stufengradienten chromatographiert (vgl. Abschnitt IV.2).

Durch die folgende Berechnung wird gezeigt, wieviel Mol ^{14}C -Putrescin pro Mol CIG-Untereinheit unter Beteiligung von F XIII_a kovalent eingebaut worden waren:

Gesamtradioaktivität der Bande (bestimmt durch Addition der Einzelradioaktivitäten der Scheiben abzüglich unspezifischen Hintergrund):

40 μg CIG = 181 pM (bezogen auf die Untereinheit) ergaben 6717 cpm

Radioaktivität von eingesetztem ^{14}C -Putrescin (bestimmt durch Verdünnung der Lösung):

22.3 μg ^{14}C -Putrescin = 138 pM ergaben ebenfalls 6717 cpm

Es haben also 181 pM CIG-Untereinheit 138 pM ^{14}C -Putrescin unter Mitwirkung von F XIII_a kovalent gebunden. Demnach hat 1 nM der CIG-Untereinheit 762 pM ^{14}C -Putrescin aufgenommen, was etwa einer zur Transamidierung befähigten Region in jeder CIG-Untereinheit entspricht.

In Abschnitt VII.1.2 wird über ein CIG-Derivat in Serum berichtet. In dasselbe wurde, analog wie hier beschrieben, in einer F XIII_a-katalysierten Transamidierungsreaktion ^{14}C -Putrescin eingeführt.



Abb. 31 Plasminolyse von CIG, verfolgt durch SDS-Gelelektrophorese (Proben nach DTE-Reduktion) 5 %ige Gele, 10 Std.; bezüglich der Referenzsubstanzen zur Molekulargewichtsbestimmung siehe Legende zu Abb. 30.

Die SDS-Gelelektrophorese der reduzierten Gemische (Abb. 31) zeigte eine nur geringfügige Abnahme der Länge der Untereinheiten von CIG während der ersten Stufen der Plasminolyse an. Analog zu den nicht reduzierten Plasminolyse-Produkten (vgl. Abb. 30) nahm die Kettenlänge bei fortschreitendem Abbau nur langsam ab. Nach 10 Minuten Plasminolyse waren die elektrophoretischen Bandenmuster der nicht DTE-reduzierten (Abb. 30) und der DTE-reduzierten Präparate (Abb. 31) nahezu identisch.

Diese Ergebnisse aus dem zeitlichen Verlauf der Plasminolyse weisen darauf hin, daß bereits in den ersten Minuten die beiden identischen CIG-Untereinheiten voneinander getrennt werden, während sich ihre Kettenlänge nur unwesentlich verkürzt. Offensichtlich sind die an der Ausbildung interchainarer Disulfid-Bindungen beteiligten Cysteinreste auf einen kleinen Bereich am Ende der beiden Peptidketten lokalisiert. Durch Abspaltung eines kurzen Peptides, das die interchainare(n) Disulfidbrücke(n) trägt, verringert sich das Molekulargewicht von CIG um etwas mehr als die Hälfte.

3. Eingrenzung der F XIII-sensitiven Region

In Abschnitt V.1 war aufgezeigt worden, daß jede CIG-Untereinheit etwa 1 Mol ^{14}C -Putrescin aufzunehmen vermag. Da das F XIII-reaktive Zentrum einen funktionell wichtigen Bereich für das Protein darstellt, gilt es hier zu klären, welches der Plasmin-Fragmente von ^{14}C -Putrescin-markiertem CIG den kovalent gebundenen Liganden trägt. Im Anschluß daran wird über die Verteilung des eingeführten Liganden bei Abbau von ^{14}C -Putrescin-CIG mit Bromcyan berichtet.

^{14}C -Putrescin-CIG, das durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt worden war, wurde einer 60 Minuten-Plasminolyse unterworfen ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.2.1). Danach wurde das Material mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das erhaltene Trennbild auf proteingebundene Radioaktivität untersucht ("EXP. TEIL", vgl. Abschnitt IV.3). In Abb. 32 ist die Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität

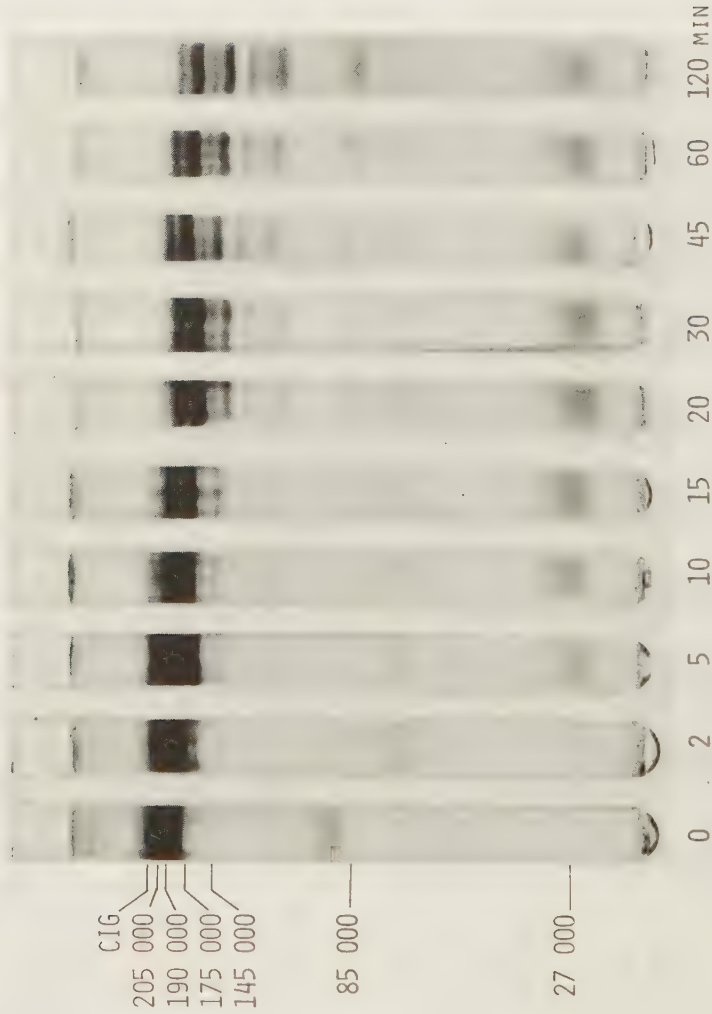


Abb. 31 Plasminolyse von CIG, verfolgt durch SDS-Gelelektrophorese (Proben nach DTE-Reduktion) 5 %ige Gele, 10 Std.; bezüglich der Referenzsubstanzen zur Molekulargewichtsbestimmung siehe Legende zu Abb. 30.

Die SDS-Gelelektrophorese der reduzierten Gemische (Abb. 31) zeigte eine nur geringfügige Abnahme der Länge der Untereinheiten von CIG während der ersten Stufen der Plasminolyse an. Analog zu den nicht reduzierten Plasminolyse-Produkten (vgl. Abb. 30) nahm die Kettenlänge bei fortschreitendem Abbau nur langsam ab. Nach 10 Minuten Plasminolyse waren die elektrophoretischen Bandenmuster der nicht DTE-reduzierten (Abb. 30) und der DTE-reduzierten Präparate (Abb. 31) nahezu identisch.

Diese Ergebnisse aus dem zeitlichen Verlauf der Plasminolyse weisen darauf hin, daß bereits in den ersten Minuten die beiden identischen CIG-Untereinheiten voneinander getrennt werden, während sich ihre Kettenlänge nur unwesentlich verkürzt. Offensichtlich sind die an der Ausbildung interchainarer Disulfid-Bindungen beteiligten Cysteinreste auf einen kleinen Bereich am Ende der beiden Peptidketten lokalisiert. Durch Abspaltung eines kurzen Peptides, das die interchainare(n) Disulfidbrücke(n) trägt, verringert sich das Molekulargewicht von CIG um etwas mehr als die Hälfte.

3. Eingrenzung der F XIII-sensitiven Region

In Abschnitt V.1 war aufgezeigt worden, daß jede CIG-Untereinheit etwa 1 Mol ^{14}C -Putrescin aufzunehmen vermag. Da das F XIII-reaktive Zentrum einen funktionell wichtigen Bereich für das Protein darstellt, gilt es hier zu klären, welches der Plasmin-Fragmente von ^{14}C -Putrescin-markiertem CIG den kovalent gebundenen Liganden trägt. Im Anschluß daran wird über die Verteilung des eingeführten Liganden bei Abbau von ^{14}C -Putrescin-CIG mit Bromcyan berichtet.

^{14}C -Putrescin-CIG, das durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt worden war, wurde einer 60 Minuten-Plasminolyse unterworfen ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.2.1). Danach wurde das Material mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das erhaltene Trennbild auf proteingebundene Radioaktivität untersucht ("EXP. TEIL", vgl. Abschnitt IV.3). In Abb. 32 ist die Verteilung der ^{14}C -Radioaktivität

innerhalb des Gels sowie ihre Zuordnung zum entsprechenden Bandenmuster dargestellt.

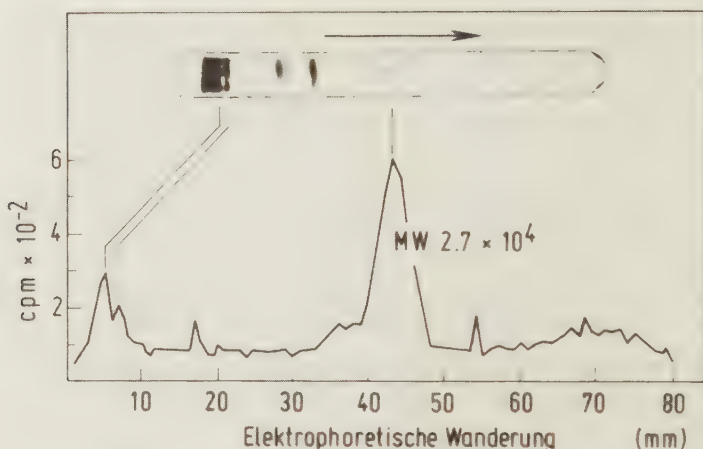


Abb. 32 Verteilung der proteingebundenen Radioaktivität eines 60-Minuten-Plasminabbaues von ^{14}C -Putrescin-markiertem CIG nach SDS-Gelelektrophorese 7.5 %iges Gel, 8 Std.; Probe nach DTE-Reduktion

Nahezu die gesamte, mit dem Liganden eingeführte Radioaktivität wurde nach 60 Minuten Plasminolyse und anschließender SDS-Gelelektrophorese in dem Fragment des Molekulargewichtes 2.7×10^4 nachgewiesen. Ein geringer Teil der Markierung wurde auch in den höhermolekularen Bruchstücken gefunden, deren elektrophoretische Beweglichkeit einem Molekulargewicht von 1.9×10^5 entspricht.

In Abschnitt V.2 war bei der Plasminolyse von unmarkiertem Material gezeigt worden, daß das Peptid vom Molekulargewicht 2.7×10^4 nicht gleich zu Beginn, sondern synchron mit einem Fragment des Molekulargewichtes 1.45×10^5 entsteht, erst nachdem die beiden Untereinheiten bereits getrennt sind. Die proteingebundene Radioaktivität im oberen Bereich des Gel

rührt offensichtlich von Bruchstücken her, von denen der Bereich mit den interchainaren Disulfidbrücken schon abgespalten, das F XIII-reaktive Zentrum jedoch noch an der Peptidkette erhalten ist.

Neben der enzymatischen Fragmentierung unter physiologischen Pufferbedingungen wurde auch die Spaltung von ^{14}C -Putrescin-CIG mit Bromcyan in 70 %iger Ameisensäure untersucht. Dazu wurde einerseits über DEAE-Cellulose gereinigtes ^{14}C -Putrescin-CIG, andererseits reduziert-carboximethylierte ^{14}C -CIG-Untereinheiten der Spaltung mit Bromcyan unterworfen ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VI.2.2). Anschließend wurden die Reaktionsgemische unter den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese getrennt, wobei die Fragmente von ^{14}C -Putrescin-CIG sowohl in nicht reduzierter Form als auch nach DTE-Reduktion untersucht wurden. Abb. 33 zeigt die elektrophoretischen Trennbilder der verschiedenen Präparate.

Die elektrophoretischen Trennbilder der mit Bromcyan erhaltenen Abbaugemische (Abb. 33) waren unterschiedlich. Material, das nativ zur Spaltung kam, ergab verschiedene Bandenmuster, je nachdem ob das Fragmentgemisch nicht reduziert (I) oder nach DTE-Reduktion (IR) untersucht wurde. Die bereits vollständig reduzierte und carboximethylierte CIG-Untereinheit lieferte ein drittes Muster der Spaltprodukte (II). In allen drei Trennbildern trat jedoch stets eine dem Molekulargewicht 2.7×10^4 entsprechende Bande auf, wie sie bereits bei der Plasminolyse von CIG (vgl. Abschnitt V.2) beobachtet worden war.

Die unterschiedlichen Bandenmuster des direkt abgebauten, nativen CIG vor (I) und nach DTE-Reduktion des Abbaugemisches (IR) zeigen, daß einige der Bromcyan-Fragmente Peptidketten enthalten, die über Disulfidbindungen verbrückt sind.

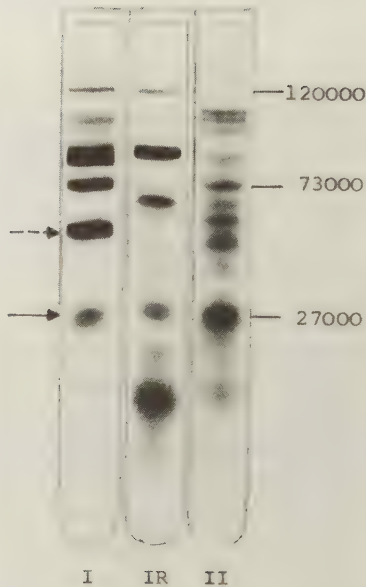


Abb. 33 SDS-Gelelektrophorese der Bromcyan-Fragmente von ^{14}C -Putrescin-markiertem CIG

I : ^{14}C -CIG nativ, BrCN-Abbau

IR: ^{14}C -CIG nativ, BrCN-Abbau, Probe DTE-reduziert

II: ^{14}C -CIG vollständig reduziert und carboximethyliert, BrCN-Abbau

Pfeil $\dashrightarrow$: Bande mit proteingebundener Radioaktivität in Gel I

Pfeil $\rightarrow$: Bande mit proteingebundener Radioaktivität in Gel I und IR

7.5 %ige Gele, 8 Std.

In Abb. 34 ist die zugehörige Verteilung der protein- gebundenen Radioaktivität dargestellt.

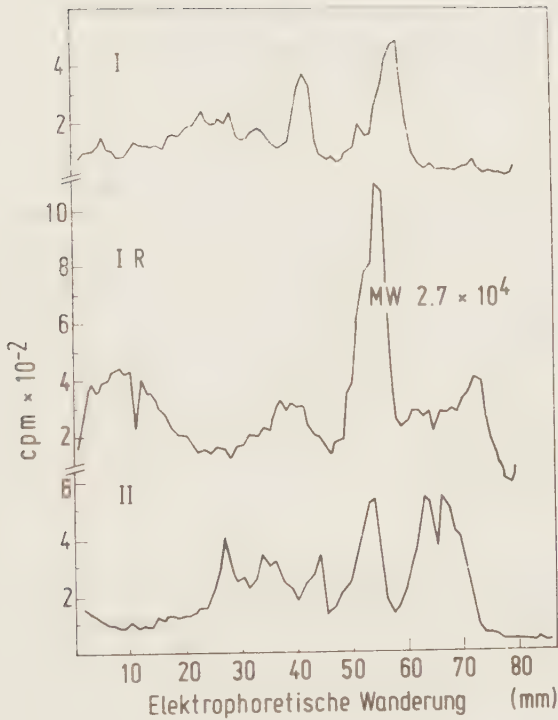


Abb. 34 Verteilung der proteingebundenen Radioaktivität zu den in Abb. 31 dargestellten Bandenmustern der SDS-Gelelektrophorese

I : ¹⁴C-CIG nativ, BrCN-Abbau
IR: ¹⁴C-CIG nativ, BrCN-Abbau, Probe DTE-reduziert
II: ¹⁴C-CIG vollständig reduziert und carboximethyliert, BrCN-Abbau
7.5 %ige Gele, 8 Std.

Im Falle der Bromcyanpeptide von nicht reduziertem ¹⁴C-Putrescin-CIG war die proteingebundene Radioaktivität im wesentlichen auf zwei Banden lokalisiert (vgl. Abb. 34, I). Nach DTE-Reduktion der Spaltprodukte war dagegen die gesamte ¹⁴C-Markierung einer einzigen Bande zuzuordnen (IR), deren elektrophoretische Beweglichkeit der schneller wandernden aus

Gel I entsprach. Ihr kam ein Molekulargewicht von etwa 2.7×10^4 zu. Demnach scheint die langsamer wandernde Bande in Gel I ein über Disulfidbindungen vernetztes Dimer, oder ein über interchainare S-S-Brücken zusammengesetztes größeres Fragment darzustellen.

Auch im Bandenmuster der Bromcyan-Fragmente der vollständig reduziert-carboximethylierten ^{14}C -CIG-Untereinheit (II) trat ein radioaktives Bruchstück vom Molekulargewicht 2.7×10^4 auf. Zudem wurde proteingebundene Radioaktivität in einigen größeren Spaltprodukten, sowie in einigen Peptiden vom Molekulargewicht $1 - 2 \times 10^4$ nachgewiesen. Offensichtlich sind die kleineren Bruchstücke durch weitere Spaltung aus dem Fragment vom Molekulargewicht 2.7×10^4 hervorgegangen, während die höhermolekularen Peptide Produkte einer unvollständigen Bromcyan-Spaltung sein dürften.

Demnach scheinen einige Methioninreste im nativen CIG der Spaltung mit Bromcyan nicht zugänglich zu sein. Gleichzeitig findet aber an der vollständig reduzierten und carboximethylierten CIG-Untereinheit eine nicht ganz vollständige Spaltung statt, insbesondere was Methioninreste im Bereich des Spaltproduktes vom Molekulargewicht 2.7×10^4 betrifft.

Wie bei den Plasminolyseprodukten von ^{14}C -CIG ist auch bei den Bromcyan-Fragmenten ein Bruchstück vom Molekulargewicht 2.7×10^4 Träger des durch F XIII_a -Beteiligung eingeführten Liganden. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Annahme einer F XIII -sensitiven Region in jeder CIG-Untereinheit.

4. Immunologische Untersuchungen

An dieser Stelle wird über neue immunologische Befunde berichtet, die weitere Aussagen zur Struktur von CIG gestatten. Es wurden die vollständig reduzierte und carboximethylierte CIG-Untereinheit (CM-CIG), ein mit Bromcyan erhaltenes Abbaugemisch (BrCN-CIG) und ein nach 20 Minuten Plasminolyse entstandenes

Spaltgemisch (Plasmin-Abb. CIG) auf ihre Reaktivität gegenüber einem gegen natives CIG gerichteten, monospezifischen Antikörper in Geldiffusion und Immunelektrophorese untersucht. Die erhaltenen Präzipitationsbilder sind in Abb. 35 zusammengestellt.

Die vollständig reduzierte und carboximethylierte CIG-Untereinheit reagierte in der Geldiffusion gegen monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum unter Bildung einer Präzipitationslinie, die zum Zeichen einer "kompletten immunologischen Identität" in Form einer Rundung in die von nativem CIG und dem Antikörper gebildeten Linie einbog (Abb. 35, oben links). In der Immunelektrophorese ergab CM-CIG einen Präzipitationsbogen, der gegenüber dem von nativem CIG gebildeten, aufgrund der eingeführten, negativ geladenen Carboximethylgruppen etwas in den α -Globulinbereich verschoben war (Abb. 35, unten links).

Geldiffusion von CIG-Abbauprodukten, erhalten entweder nach 20 Minuten Plasminolyse oder nach BrCN-Abbau, gegen Anti-Human-CIG-Antiserum ergab für beide Präparate je eine starke Präzipitationslinie (Abb. 35, oben rechts). Beide bogen in jene von intaktem, nativem CIG und dem Antikörper gebildeten Linie in Form einer Rundung zum Zeichen einer "kompletten immunologischen Identität" ein. Bei der Immunreaktion von BrCN-CIG und dem Antiserum war zusätzlich eine Linie zu beobachten, die von rascher diffundierenden Anteilen herrührte. Die Immunelektrophorese zeigte bei beiden Fragmentierungsgemischen ebenfalls eine positive Reaktion mit Anti-CIG-Antiserum an (Abb. 35, unten rechts). Im Falle des plasminolysierten Materials wurden verschiedene diffuse Präzipitationsbögen im CIG-Bereich gefunden. Bei dem mit Bromcyan abgebauten Material erschienen einige diffuse Bögen, die gegenüber intaktem, nativem CIG etwas in den α -Globulinbereich verschoben waren, sowie ein zusätzlicher Bogen im Bereich der β -Globuline.

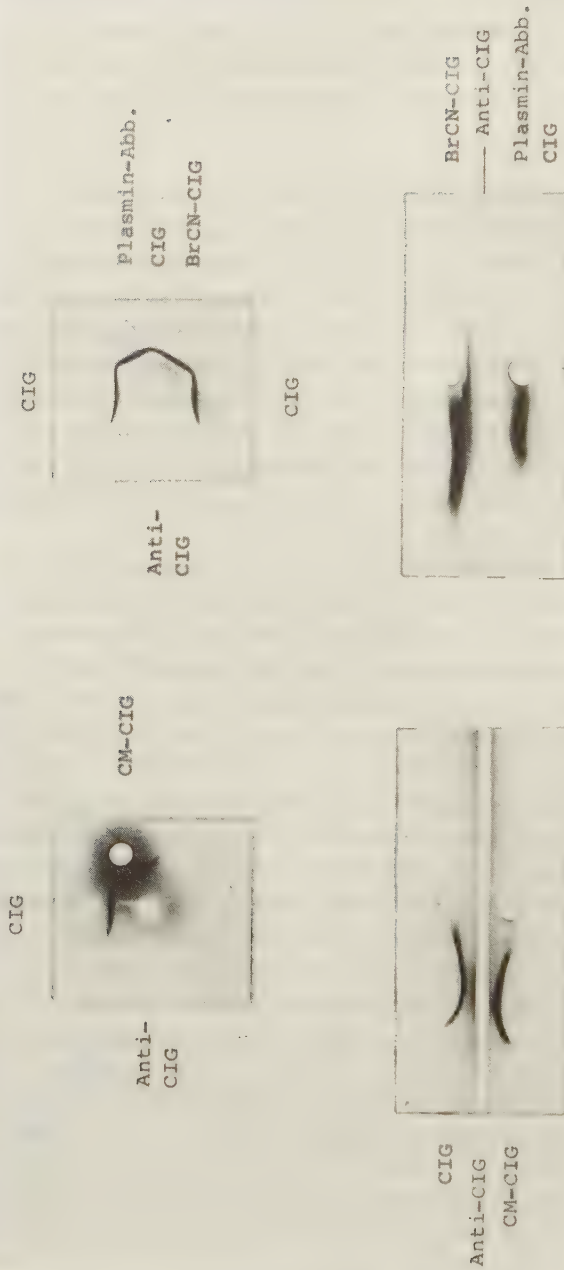


Abb. 35 Geldiffusion (oben) und Immunelektrophorese (unten) von CIG und CIG-Derivaten gegen monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum
CM-CIG: vollständig reduziertes und carboximethyliertes CIG; BrCN-CIG: Bromcyan-Abbaugeschwindigkeit von CIG; Plasmin-Abb. CIG: 20 Minuten-Plasmin-Abbaugeschwindigkeit von CIG; CIG: intaktes, natives CIG.

Diese qualitativen Befunde besagen, daß die Immun-determinanten im nativen Protein in der Hauptsache sequen-zieller und weniger konformativer Natur sind. Letztere wür-den unter den denaturierenden Bedingungen der vollständigen Reduktion entfaltet und damit zerstört. Offensichtlich lie-gen die beiden Peptidketten im nativen Molekül weitgehend unabhängig voneinander vor oder stoßen sich möglicherweise sogar räumlich ab. Die Ergebnisse liefern weiterhin gute Evidenz, daß der mit Plasmin bereits sehr früh abspaltbare interchainare Disulfidbereich, aber auch die für F XIII_a sensitive Region keine oder nur wenige antigenen Determi-nanten besitzen. Demnach scheint der Großteil immunologi-scher Aktivität innerhalb der Peptidkette, die durch Plasmin lediglich geringfügig verkürzt wird, lokalisiert zu sein. Selbst nach Bromcyan-Abbau liegen noch CIG-Bruchstücke vor, die, verglichen mit CIG, "immunologisch komplett identisch" zu reagieren vermögen.

VI. Zur Wechselwirkung von CIG mit Matrixsubstanzen

Kälte-unlösliches Globulin (CIG) stellt, wie in der EINFÜHRUNG dieser Arbeit erwähnt, die plasmatische Form eines Oberflächenproteins von Fibroblasten dar. Eine Funktion die-ses Proteins an der Zelloberfläche besteht möglicherweise darin, die Zelle auf Matrixsubstanzen wie Fibrin und Kollagen zu verankern, was für die Biosynthese von frischem Bindege-webe, beispielsweise nach Auftreten einer Wunde, notwendig ist. Diese Aufgabe würde voraussetzen, daß CIG zur Wechsel-wirkung mit den genannten Matrixsubstanzen befähigt ist.

Innerhalb dieses Abschnittes wird die Affinität von CIG zu Fibrin und Kollagen an löslichen und immobilisierten Monomeren dieser Matrixsubstanzen studiert. Dazu wird die Methode der Affinitätschromatographie, die Technik der pas-siven Hämagglutination, ein Protein-Sepharose-Beladungstest und ein radio-immunologischer Protein-Bindungstest verwendet.

Zunächst sollen lösliches Fibrinmonomer und vergleichsweise Fibrinogen, im Anschluß daran verschiedene Kollagentypen auf ihre Wechselwirkung zu CIG untersucht werden.

1. Lösliches Fibrinmonomer und Fibrinogen

1.1 Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie

CIG, gelöst in 0.1M NaCl, pH 7.6, wurde in einem Parallelexperiment an immobilisiertem Fibrinogen und Fibrinmonomer bei 4 °C chromatographiert (nicht adsorbiertes Material = Fraktion A). Desorbiert wurde zweistufig: zunächst mit 0.1M NaCl, pH 7.6, bei 37 °C (Fraktion B), anschließend bei 4 °C mit 1M KBr, pH 5.3, bei 4 °C (Fraktion C). Die erhaltenen Elutionsprofile sind in Abb. 36 dargestellt.

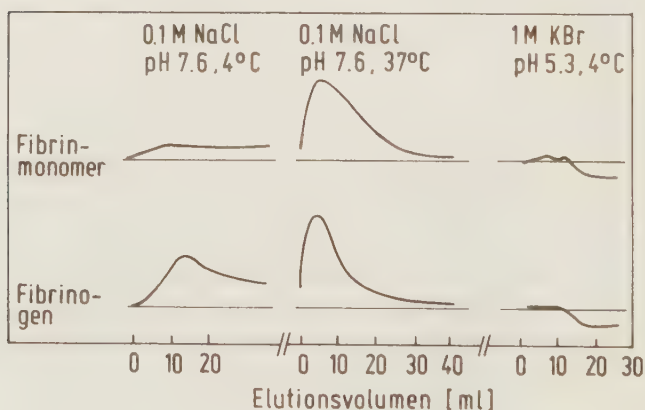


Abb. 36 Affinitätschromatographie von CIG an immobilisiertem Fibrinmonomer und an immobilisiertem Fibrinogen

Säule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 19.5 ml / Std.; aufgetragen: jeweils 8 mg CIG in 3 ml 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, 4 °C; Desorption: zweistufig, zunächst mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 37 °C, dann mit 0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C.

Im Falle des immobilisierten Fibrinmonomer blieb nach dem Auftragen bei 4 °C fast alles CIG auf der Säule. Nach Erwärmen der Säule auf 37 °C erschien dann der größte Teil des Materials, so daß anschließend mit 1M KBr bei 4 °C nur mehr eine geringfügige CIG-Menge desorbiert wurde. An immobilisiertem Fibrinogen wurde CIG bereits bei 4 °C nur teilweise adsorbiert, während der locker gebundene Rest bei 37 °C unter physiologischen Pufferbedingungen eluiert wurde.

Die Affinität von CIG zu Fibrinmonomer ist deutlich nachweisbar, erreicht jedoch nicht die Stärke der Affinität von Fibrinogen zu Fibrinmonomer. Dort war die Wechselwirkung mit dem immobilisierten Partner so stark, daß das adsorbierte Fibrinogen auch bei 37 °C haften blieb und erst mit dem bro-midhaltigen Puffer erschien (vgl. Abschnitt I.2). Eine Vor-inkubation von CIG mit Thrombin vermochte seine Affinität zu Fibrinmonomer nicht zu verstärken.

Zwischen CIG und Fibrinogen scheint eine schwächere Wechselwirkung zu bestehen. Bislang ist noch offen, ob und inwieweit sich adsorbierbare und nicht adsorbierbare Anteile von CIG unterscheiden.

Die Befunde aus der Affinitätschromatographie von CIG an immobilisiertem Fibrinmonomer bzw. Fibrinogen wurden durch eine Chromatographie von Plasma an immobilisiertem CIG erweitert. Im einen Teil des Experimentes war die Plasmaprobe (3 ml) unterschwellig mit Thrombin behandelt worden (vgl. Abschnitt III.1.2), im anderen Teil wurde Plasma ohne limitierte Thrombinbehandlung chromatographiert (Säule: 0.8 x 20 cm; Durchfluß: 20 ml / Std.). Die Desorption erfolgte einstufig mit 1M KBr, pH 5.3, bei 4 °C (Fraktion C). Die jeweiligen C-Fraktionen wurden in der SDS-Gelelektrophorese untersucht. In Abb. 37 sind die Scandigramme der elektrophoretischen Trennbilder dieser Fraktionen gegenübergestellt.

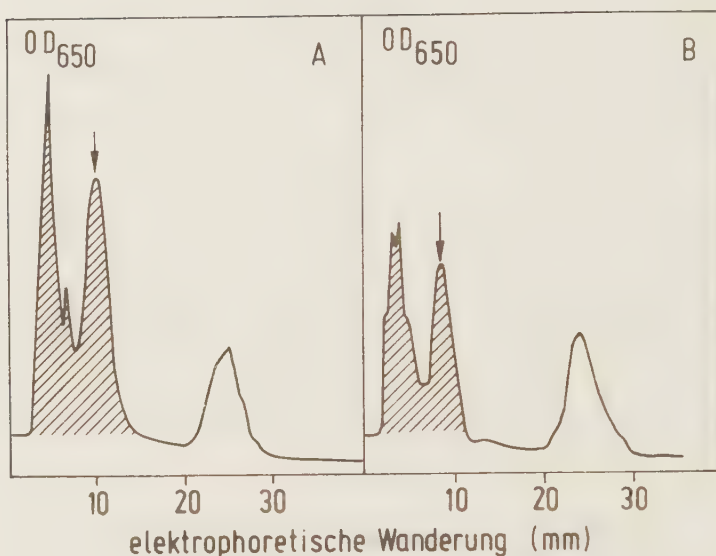


Abb. 37 SDS-Gelelektrophorese der C-Fractionen erhalten nach Affinitätschromatographie von Plasma an immobilisiertem CIG (Scandiagramme)

A: Plasma mit limitierter Thrombin-Inkubation

B: Plasma ohne limitierte Thrombin-Inkubation

5 %ige Gele, 10 Std.; Proben nicht DTE-reduziert

Aus unbehandeltem Plasma wurde an immobilisiertem CIG eine Proteinfraction zurückgehalten, die unter den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese in drei Banden aufspaltete (Abb. 37, B). Diejenige mit der geringsten Mobilität enthielt neben CIG vor allem Disulfid-vernetzte Oligomere, die zweite wies die Beweglichkeit von fibrinogenem Material auf, während die am schnellsten wandernde Bande die Mobilität von γ -Globulinen zeigte. Nach limitierter Thrombinbehandlung wurde ein ähnliches Bandenmuster erhalten (A), wobei die Intensität der beiden ersten Banden im elektrophoretischen Trennbild, bezogen auf die Intensität der Immunglobulin-Bande, deutlich größer war.

Auch die Experimente zeigen, daß CIG eine beträchtliche Affinität zu Fibrinmonomer besitzt, während Fibrinogen nur unvollständig adsorbiert wird.

1.2 Protein-Sepharose-Beladungstest

Als Ergänzung zur Methode der Affinitätschromatographie wurde die Adsorption von radioaktiv-markiertem Protein an einem immobilisierten Partner in einem Röhrchentest ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VII.2) verfolgt. Zunächst wurde die Beladbarkeit von immobilisiertem Fibrinmonomer bzw. immobilisiertem Fibrinogen mit ^{125}J -CIG untersucht. Da Fibrinmonomer-Sepharose aus Fibrinogen-Sepharose durch Thrombinbehandlung hervorgegangen war ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt II.2.1), sind beide immobilisierten Proteinproben in ihrer Beladbarkeit gut vergleichbar. Tab. 13 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

Adsorbens	Adsorbierter Anteil (%) ^{125}J -CIG
immob. Fibrinmonomer	45.5
immob. Fibrinogen	1.6
Sepharose 6B (1. Kontrolle)	0.6
Puffer (2. Kontrolle)	0.3

Tabelle 13 Beladung von Fibrinmonomer- bzw. Fibrinogen-Sepharose 6B durch ^{125}J -CIG

Eingesetzt: 200 ng ^{125}J -CIG adsorbiert an 50 mg Adsorbens in 600 μl 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.5 % BSA, 0.04 % Tween 20, 0.005M CaCl_2 , pH 7.4; Inkubation: 4 Std. bei 4 °C; Waschen: zweimal mit je einem Milliliter Puffer;

Immobilisiertes Fibrinmonomer vermochte unter diesen Versuchsbedingungen etwa 50 % des angebotenen CIG zu adsorbieren, während immobilisiertes Fibrinogen dazu nur unwesentlich bzw. überhaupt nicht in der Lage war.

Umgekehrt wurde die Beladbarkeit von immobilisiertem CIG durch ^{125}J -Fibrinogen bzw. ^{125}J -Fibrinmonomer, das daraus dargestellt war, ermittelt. Dazu wurde markiertes Fibrinogen vollständig in lösliches Fibrin übergeführt, in wenig lyotropem Puffer aufgelöst und mit einer kalten physiologischen Fibrinogenlösung verdünnt.

Es wurden 2 mg ^{125}J -Fibrinogen in 4 ml 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.4, durch Zugabe von 10 NIH-Einheiten Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke AG, Marburg), gelöst in 100 μl Tris/NaCl/EDTA, zur Gerinnung gebracht. Nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Gerinnsel auf einem Seidentuch synäresiert, mehrmals in PBS gewaschen, ausgedrückt und schließlich in 500 μl 0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3 wiederaufgelöst. Nach scharfer Zentrifugation wurde diese Lösung mit einer nicht markierten Fibrinogenlösung in 0.05M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, soweit verdünnt, daß schließlich in 100 μl Lösung 300 ng ^{125}J -Fibrinmonomer neben 30 μg kaltem Fibrinogen (= 100facher Überschuß) vorlagen. ^{125}J -Fibrinogen wurde mit nicht markiertem Fibrinogen in einer entsprechenden Weise verdünnt.

In Tab. 14 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen aufgeführt.

Adsorbens	Adsorbierter Anteil (%)	
	^{125}J -Fibrinmonomer	^{125}J -Fibrinogen
immob. CIG	68.9	37.7
Sepharose 4B (1. Kontrolle)	1.8	1.5
Puffer (2. Kontrolle)	0.7	0.5

Tabelle 14 Beladung von CIG-Sepharose 4B durch ^{125}J -Fibrinmonomer bzw. ^{125}J -Fibrinogen

Eingesetzt: 300 ng ^{125}J -Fibrinmonomer bzw. ^{125}J -Fibrinogen in 100 μl 0.05M Tris-HCl, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, das 30 μg nicht markiertes Fibrinogen enthielt; Adsorption: an 50 mg Adsorbens in 500 μl 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.5 % BSA, 0.04 % Tween 20, 0.005M CaCl, pH 7.4; Inkubation: 4 Std. bei 4 °C; Waschen: zweimal mit je einem Milliliter Puffer;

Von dem in Gegenwart von überschüssigem Fibrinogen in Lösung gehaltenen Fibrinmonomer wurde an immobilisiertem CIG nur etwa zwei Drittel adsorbiert. In diesem Zusammenhang ist

zu berücksichtigen, daß Fibrinmonomer auch zum anwesenden Fibrinogen, durch welches es in Lösung gehalten wird, eine Affinität besitzt (vgl. Abschnitt I.2).

Anders als bei der Wechselwirkung von immobilisiertem Fibrinogen mit freiem CIG (vgl. Tab. 13) wurde bei der Inkubation von freiem Fibrinogen mit immobilisiertem CIG ein beträchtlicher Teil des Fibrinogens adsorbiert. Offensichtlich hängen die experimentellen Befunde davon ab, welche der Komponenten im immobilisierten Zustand eingesetzt wird. Eine mögliche Erklärung dieser scheinbaren Diskrepanz besteht darin, daß nach neuesten Angaben von Stathakis und Mosesson (89) an der Wechselwirkung von Fibrinogen und CIG die äußeren Bereiche der Fibrinogen- α -Ketten beteiligt sind. Gerade über diese Teile wird jedoch Fibrinogen aufgrund von Untersuchungen von Matthias et al. (149) bei der Immobilisierung nach der Bromcyanmethode an Sepharose gekoppelt, so daß in diesem Fall keine Affinität zwischen immobilisiertem Fibrinogen und CIG zustande kommen kann, obwohl die beiden Komponenten im freien Zustand dazu befähigt wären.

1.3 Agglutination von Fibrinogen- und Fibrinmonomer-beladenen Erythrocyten durch CIG

Im Anschluß an die Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie und Beladung von immobilisierten Proteinen wurde die Wechselwirkung von CIG zu Fibrinmonomer und Fibrinogen mit der Technik der passiven Hämagglutination getestet. Hierzu wurden Erythrocyten eingesetzt, deren Oberfläche mit Fibrinogen beladen war ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt V.2). Fibrinmonomer-beladene Erythrocyten waren aus Fibrinogen-Erythrocyten durch Inkubation einer 0.25 %igen Suspension in PBS mit 50 NIH-Einheiten Thrombin / ml für 2 Std. bei 37 °C hergestellt worden. Die Ergebnisse dieser Agglutinationsexperimente sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

Erythrocyten beladen mit	Reaktion mit CIG	Reaktion mit Anti- F'gen bis Verdünnung
Fibrinogen	keine Agglutina- tion	Agglutination bis 1 : 1024
Fibrinmonomer	spontane Agglu- tination gehemmt	spontane Agglu- tination gehemmt

Tabelle 15 Agglutination von Fibrinogen- und Fibrinmonomer-
beladenen Erythrocyten durch CIG (direkter Test)

Ausgangskonzentration von CIG: 2000 μg / ml

In diesem Test wurde keine Agglutination von Fibrinogen-beladenen Erythrocyten durch CIG beobachtet. Fibrinmonomer-beladene Erythrocyten agglutinierten spontan bereits in Abwesenheit von CIG. Die Zugabe von CIG hatte eine Inhibition der Agglutination zur Folge. Ein ähnliches Verhalten der Fibrinmonomer-beladenen Erythrocyten wurde nach Zugabe von Anti-Fibrinogen-Antiserum beobachtet.

Diese Befunde sind mit einer Interaktion zwischen CIG und Fibrinmonomer im Einklang. Hinweise auf eine Wechselwirkung von Fibrinogen mit CIG wurden in diesem Testsystem nicht erhalten.

1.4 Fibrinogen und Fibrinmonomer im Bindungstest mit CIG

^{125}J -Fibrinogen und ^{125}J -Fibrinmonomer, das in Lösungen von ^{125}J -Fibrinogen nach unterschwelliger Thrombineinwirkung entstanden war, wurde mit CIG inkubiert und die gebildeten Assoziate mit Anti-CIG-Antiserum präzipitiert.

Es wurden 1.5 ml einer ^{125}J -Fibrinogenlösung der Konzentration 0.5 mg / ml in 0.1M Tris-HCl, 0.1 NaCl, 0.001M EDTA, pH 7.4, mit 0.1 NIH-Einheiten Thrombin (Thrombinum purum, Behringwerke AG, Marburg), gelöst in 100 μl Tris/NaCl/EDTA, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden zur Hemmung der Thrombinaktivität 2 Einheiten Hirudin (Sigma Chemical Company, St. Louis) als Festsubstanz zugegeben und weitere 15 Minuten

bei 37 °C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine ^{125}J -Fibrinogen-Konzentration von 1 μg / ml verdünnt und für den Bindungstest "EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VII.1) eingesetzt. ^{125}J -Fibrinogen ohne Thrombininkubation wurde in ähnlicher Weise behandelt, jedoch anstatt der Thrombinlösung eine entsprechende Menge Puffer zugegeben.

Die Aufnahme von ^{125}J -Protein ist in Abb. 38 in Abhängigkeit von der CIG-Konzentration dargestellt.

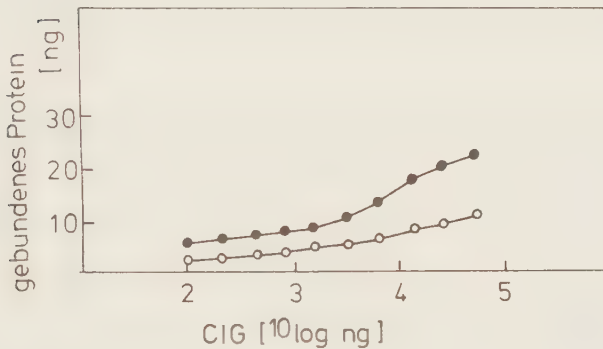


Abb. 38 Fibrinogen mit (●-●-●) und ohne (o-o-o) limitierte Thrombininkubation im Bindungstest mit CIG

Eingesetzt: 100 ng ^{125}J -Fibrinogen (konstant); 50 μg CIG in der höchsten Konzentration (Verdünnungsreihe, Zweierstufen); Inkubation: 20 Std. bei 4 °C; Präzipitation: durch 200 μl Anti-Human-CIG-Antiserum bei 4 °C, 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

Unter den Bedingungen des Testes wurden von 50 μg CIG nur 11 ng ^{125}J -Fibrinogen gebunden und im Präzipitat anhand der Radioaktivität wiedergefunden. Für das unterschwellig Thrombin-behandelte ^{125}J -Fibrinogen ergab sich mit 23 ng ein etwa doppelt so hoher Wert für den durch CIG aufgenommenen Anteil.

Berücksichtigt man, daß unter den Bedingungen der limitierten Thrombininkubation sowohl im Plasma als auch in Fibrinogenlösungen nur etwa 10 - 15 % des fibrinogenen Materials in Fibrinmonomer überführt werden (26), so kommt die zusätzliche Aufnahme im Falle des Thrombin-behandelten ¹²⁵J-Fibrinogens gegenüber dem nicht behandelten einer vollständigen Bindung der erzeugten Fibrinmonomeren nahe. Dazu ist unter den Versuchsbedingungen ein etwa 2000facher molarer Überschuß an CIG erforderlich. Diese ungünstige Stöchiometrie ist offensichtlich durch eine Konkurrenzreaktion bedingt, bei der Fibrinmonomer außer mit CIG auch mit gleichzeitig vorhandenem Fibrinogen Assoziate bildet (vgl. auch Tab. 14).

Die bisher angeführten Untersuchungen zur Interaktion von fibrinogenem Material mit CIG weisen auf eine beträchtliche Affinität zwischen Fibrinmonomer und CIG hin. Zwischen CIG und Fibrinogen tritt, wenn überhaupt, eine wesentlich schwächere Wechselwirkung in Erscheinung.

2. Kollagen

In Abschnitt VI.1 war mit verschiedenen Methoden eine beträchtliche Wechselwirkung zwischen löslichem Fibrinmonomer und CIG aufgezeigt worden. Zwischen Fibrinogen und CIG war diese Affinität wesentlich schwächer. An dieser Stelle sollen nun verschiedene Kollagentypen auf ihre Wechselwirkung mit CIG untersucht werden, wobei die in Abschnitt VI.1 vorgestellten Methoden angewandt wurden.

2.1 Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie

CIG, gelöst in 0.1M NaCl, pH 7.6, wurde in einem Parallelexperiment an immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ, Typ I-nativ und Typ I-denaturiert bei 4 °C adsorbiert (nicht adsorbiertes Material = Fraktion A). Die Desorption erfolgte, wie bei den Versuchen an immobilisiertem Fibrinogen und Fibrinmonomer (vgl. Abschnitt VI.1) zweistufig: zunächst mit 0.1M NaCl, pH 7.6 bei 37 °C (Fraktion B), anschließend bei 4 °C mit 1M KBr, pH 5.3 (Fraktion C). In Abb. 39 ist das chromatogra-

phische Verhalten von CIG an diesen immobilisierten Kollagen-
typen dargestellt.

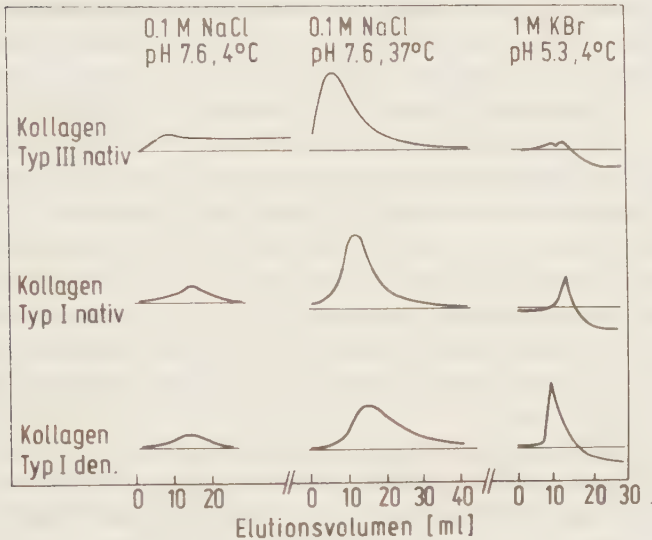


Abb. 39 Affinitätschromatographie von CIG an immobilisiertem Kollagen

Säule: jeweils 0.8 x 20 cm; Durchfluß: jeweils 19.5 ml / Std.;
aufgetragen: jeweils 8 mg CIG in 3 ml 0.05M Tris, 0.1M NaCl,
0.025M EACA, pH 7.6, 4 °C; Desorption: zweistufig, zunächst
mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6, bei 37 °C,
dann mit 0.05M Tris, 1M KBr, 0.025M EACA, pH 5.3, bei 4 °C.
Immobilisiertes Kollagen Typ III-denaturiert wurde aufgrund
seiner großen Renaturierungstendenz nicht als Affinitätsma-
terial untersucht.

CIG wurde von immobilisiertem Kollagen Typ III-nativ
bei 4 °C unter physiologischen Pufferbedingungen nicht voll-
ständig adsorbiert, hingegen trat ständig eine kleine Protein-
menge aus der Säule aus. Beim Erwärmen auf 37 °C erschien so-
fort das gesamte zurückgehaltene CIG, so daß mit 1M KBr bei
4 °C keine Fraktion mehr eluiert wurde. Von nativem Kollagen

Typ I hingegen blieb, von einer geringen nicht adsorbierten Menge abgesehen, das gesamte aufgebrauchte CIG auf der Säule. Es wurde größtenteils (80 - 85 % des gesamten adsorbierbaren Anteils) nach Erwärmen auf 37 °C desorbiert, während ein geringer Teil (15 - 20 %) erst anschließend mit 1M KBr bei 4 °C abgelöst wurde. An immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert wurden nur mehr 60 - 65 % des adsorbierbaren Materials bei 37 °C als Fraktion B erhalten, während 35 - 40 % erst mit 1M KBr bei 4 °C desorbiert wurden. Die Affinität von CIG zu den untersuchten immobilisierten Kollagentypen wurde weder nach Thrombininkubation von CIG, noch nach Behandlung von CIG mit aktiviertem Faktor XIII verändert.

CIG vermag mit den drei immobilisierten Kollagenpräparaten offensichtlich unterschiedlich stark in Wechselwirkung zu treten. Am stärksten wird CIG von immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert, am schwächsten von Kollagen Typ III-nativ zurückgehalten. Aufgrund der späteren Ergebnisse muß die Mittelstellung von Kollagen Typ I-nativ in diesem Zusammenhang angezweifelt werden. Eine partielle Denaturierung des immobilisierten Kollagens Typ I-nativ kann nämlich nicht ausgeschlossen werden, zumal das Affinitätsmaterial bei seiner Herstellung mit 2.5M KSCN gewaschen worden war ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt II.2). In Abschnitt IV.1 war dieses Adsorbens zu einer neuartigen präparativen Anreicherung von CIG aus Plasmafraktionen mittels Affinitätschromatographie herangezogen worden. Begleitendes Fibrinogen wird von diesem Affinitätsmaterial nur geringfügig adsorbiert, während CIG vollständig zurückgehalten wird.

2.2 Beladung von immobilisiertem CIG mit Kollagen

Ergänzend zur Affinitätschromatographie wurde hier die Beladbarkeit von immobilisiertem CIG durch ¹²⁵J-Kollagen untersucht. In diesem Adsorptionstest ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VII.2) wurde lösliches Kollagen Typ I, II und III-nativ und nach Hitzedenaturierung eingesetzt und die adsorbierbaren Anteile nach 4 und nach 20 Stunden bestimmt. Zur

Kontrolle wurde auch die Adsorption von Kollagen an unbehandelte Sepharose ermittelt. In Tab. 16 ist das Ergebnis dieses Experimentes zusammengefaßt.

Von den denaturierten Kollagenpräparaten wurde Typ III-denaturiert am stärksten von immobilisiertem CIG adsorbiert, doch auch Kollagen Typ I und Typ II zeigte nach Hitze-denaturierung beträchtliche Affinität. Die adsorbierten Proteinmengen änderten sich nach 20 Std. gegenüber 4 Std. Inkubation nur geringfügig. Von den nativen Kollagentypen wurde lediglich Typ III in nennenswertem Maße zurückgehalten. Hier war der Bindungsvorgang nach 4 Std. noch nicht abgeschlossen. Nach 20 Std. war die adsorbierte Menge an nativem Material etwa halb so groß, wie die von Kollagen Typ III-denaturiert. Das native Präparat wies im Gegensatz zum denaturierten aber auch eine nicht mehr zu vernachlässigende Affinität zu unbehalteter Sepharose (K_1 -Wert) auf.

Unter Berücksichtigung dieses relativ hohen K_1 -Wertes ergibt sich, daß unter den Versuchsbedingungen natives Kollagen Typ III schwächer als denaturiertes Kollagen Typ I und II gebunden wird. Natives Kollagen Typ I und II wird von immobilisiertem CIG praktisch nicht zurückgehalten.

Beladung mit 125 J-Kollagen	Adsorbierter Anteil (%) an CIG-Sephärose 4B nach 4 Std. nach 20 Std.	Adsorbierter Anteil (%) an Sephärose 4B (K ₁) nach 4 Std. nach 20 Std.
Typ I-denaturiert	38.3	0.9
Typ II-denaturiert	49.6	1.2
Typ III-denaturiert	71.2	2.8
Typ I-nativ	4.4	0.7
Typ II-nativ	6.6	1.2
Typ III-nativ	28.6	8.3

Tabelle 16 Beladung von CIG-Sephärose durch 125 J-Kollagen
 Eingesetzt: 100 ng 125 J-Kollagen in 100 µl 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.5 % BSA, 0.04 %
 Tween 20, 0.005M CaCl₂, pH 7.4; Adsorption: an 50 mg Adsorbens in 500 µl Puffer suspendiert;
 Inkubation: 4 bzw. 20 Std. bei 4 °C; Waschen: zweimal mit je einem Milliliter Puffer. Die
 Werte der mitgeführten Pufferkontrollen in Abwesenheit von Sephärose (K₀) lagen in allen
 Fällen bei 0.3 - 0.4 %.

2.3 Agglutination von Kollagen-beladenen Erythrocyten durch CIG

Die Wechselwirkung von CIG mit den Kollagentypen I-nativ, I-denaturiert und III-nativ, wie sie mittels Affinitätschromatographie in Abschnitt VI.2.1 aufgezeigt worden war, wurde hier mit der Technik der passiven Hämagglutination unter Verwendung von Kollagen-beladenen Erythrocyten überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

Erythrocyten beladen mit Kollagen	Agglutination mit CIG bis Verdünnung	Agglutination mit Typ- spezifischem Anti- Kollagen bis Verd.
Typ I-nativ	1 : 1024	1 : 1024
Typ I-denaturiert	1 : 1024 (512)	1 : 1024 (512)
Typ III-nativ	1 : 1024 (512)	1 : 1024 (512)

Tabelle 17 Agglutination von Kollagen-beladenen Erythrocyten durch CIG. Vergleich mit Typ-spezifischen Anti-Kollagen-Antiseren (direkter Test)

Ausgangskonzentration von CIG: 2000 µg / ml; Anti-Kollagen-Antiseren: gerichtet gegen Kalbskollagen, erhalten aus Kaninchen, Titer bestimmt durch Gelpräzipitation: 1 : 64 (Gabe von Dr. R. Timpl). Die Pufferkontrolle war bei allen getesteten Erythrocyten negativ.

CIG führte zu einer Agglutination der Kollagen-beladenen Erythrocyten bis zu einer Verdünnung von 1 : 1024, was einer Konzentration von etwa 1 µg / ml entspricht. Bis zur selben Verdünnung waren auch die mitgeführten Typ-spezifischen Anti-Kollagen-Antikörper wirksam. Die durch CIG beobachtete Agglutination verschiedener Kollagen-beladener Erythrocyten reicht somit in den Bereich einer echten Antigen-Antikörper-Reaktion hinein. Exaktere Aussagen quantitativer Art zur Abstufung der Affinitäten zwischen CIG und Kollagen waren mit

diesem Test nicht zu erhalten, qualitativ wurde die mittels Affinitätschromatographie und Protein-Sepharose-Beladung aufgezeigte Wechselwirkung beider Komponenten zumindest bestätigt.

2.4 Kollagen im Bindungstest mit CIG

^{125}J -Kollagen Typ I, II und III wurden in Lösung nativ und nach Hitzedenaturierung mit unterschiedlichen Mengen CIG inkubiert und die gebildeten Assoziate mit Anti-CIG-Antiserum präzipitiert. Die Aufnahme von markiertem Kollagen in Abhängigkeit von der CIG-Konzentration ist in Abb. 40 dargestellt.

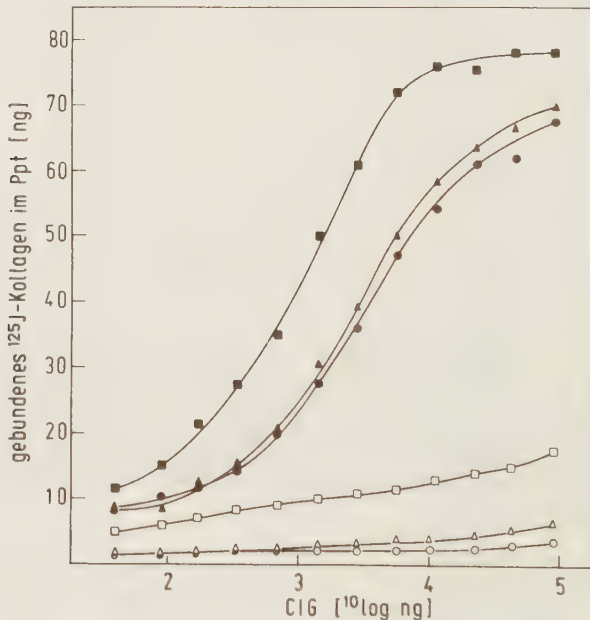


Abb. 40 Lösliches Kollagen im Bindungstest mit CIG

□-□-□: Typ III-nativ; ■-■-■: Typ III-denaturiert; Δ-Δ-Δ: Typ II-nativ; ▲-▲-▲: Typ II-denaturiert; o-o-o: Typ I-nativ; ●-●-●: Typ I-denaturiert; Denaturierung: 40 Min., 50 °C; Eingesetzt: 100 ng ^{125}J -Kollagen (konstant); 50 µg CIG in der höchsten Konzentration (Verdünnungsreihe, Zweierstufen); Inkubation: 20 Std. bei 4 °C; Präzipitation: durch 200 µl Anti-Human-CIG-Antiserum bei 4 °C, 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

Die stärkste Assoziatbildung zwischen CIG und Kollagen mit einem Endwert von etwa 80 % wurde für denaturiertes Kollagen Typ III beobachtet. Hier waren zur halbmaximalen Präzipitation von 100 ng Kollagen Typ III-denaturiert etwa 2 µg CIG erforderlich. Denaturiertes Kollagen Typ I und II benötigte dazu eine etwas größere CIG-Menge. Wesentlich schlechter als denaturiertes Kollagen wurde unter diesen Testbedingungen das native Kollagen präzipitiert. So wurde nur für natives Kollagen Typ III eine meßbare Assoziatbildung mit CIG nachgewiesen. Sie lag jedoch auch bei maximaler CIG-Konzentration bei weniger als 20 % des eingesetzten Kollagens. Für die Kollagentypen I und II wurde im nativen Zustand unter den Testbedingungen keine Affinität zu CIG beobachtet.

Der Radio-Kollagen-Bindungstest scheint das verlässlichste Untersuchungssystem zur Abschätzung der Affinität von CIG zu Kollagen zu sein. Seine experimentelle Aussage deckt sich weitgehend mit den Befunden der Beladung von immobilisiertem CIG mit verschiedenen ¹²⁵J-Kollagenen. Beide Testsysteme deuten darauf hin, daß von den untersuchten Kollagentypen der Typ III nach Denaturierung die höchste Affinität zu CIG aufweist. Es folgen als etwa gleich wirksame Präparate denaturiertes Kollagen Typ I und II. Eine Wechselwirkung von CIG zu nativem löslichem Kollagen ist nur für Typ III nachweisbar, während Kollagen Typ I und II im nativen Zustand dazu offensichtlich nicht befähigt sind. In diese Reihenfolge der Affinitäten lassen sich auch die Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Kollagen einordnen, unter Berücksichtigung, daß das eingesetzte immobilisierte Kollagen Typ I-nativ möglicherweise bereits partiell denaturiert vorlag (vgl. Abschnitt VI.2.1). Die Methode der passiven Hämagglutination von Kollagen-beladenen Erythrocyten durch CIG hat sich als wenig spezifisch herausgestellt.

VII. Biologische Funktionen von CIG

Die in Abschnitt VIII angeführten Untersuchungen hatten CIG als Plasmafaktor mit Affinität zu Matrixsubstanzen wie Kollagen und Fibrin ausgewiesen. Nun wird über Experimente berichtet, die dieser biochemisch nachweisbaren Wechselwirkung eine biologische Relevanz zuweisen sollen.

In der Literatur sind zwei nicht vollständig identifizierte Serumfaktoren beschrieben, deren biologische Wirkung auf einer Interaktion mit Kollagen beruht. Dies ist einerseits der von Maurer (150) entdeckte "Anti-Gelatine-Faktor (AGF)", ein Serumfaktor, mit spezifischer Affinität zu Gelatine, und das von Klebe (151) gefundene "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)", welches das Anhaften von Fibroblasten an einer Kollagenmatrix vermittelt.

Da das Verhalten der beiden Serumfaktoren AGF und c-CAP auf die Wechselwirkung mit Kollagen schließen ließ, wurde ein Vergleich dieser Faktoren mit CIG in protein- und immunchemischer Hinsicht angestellt. Zudem wurde geprüft, inwieweit die für die Serumfaktoren beschriebene biologische Wirksamkeit auch von gereinigtem CIG erbracht werden kann.

1. Verwandtschaft von CIG und Anti-Gelatine-Faktor (AGF)

Bereits weit zurückliegende Arbeiten verschiedener Autoren befaßten sich mit einem Serumfaktor mit spezifischer Affinität zu Gelatine. Als erster hatte Maurer (150) eine Präzipitatbildung bei Zusatz von Gelatine und Polyoxigelatine zu Serum beobachtet. Dieses Phänomen wurde in den folgenden Jahren von zahlreichen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden studiert, ohne daß es gelang, die wirksame Komponente als Reinsubstanz zu isolieren. Wolff et al. (152) konnten sie in der Euglobulinfraktion von Serum anreichern und Hinweise für eine Aktivierung durch einen zweiten Serumbestandteil erbringen. Nach Gelifiltration an Sephadex G-200 war die AGF-Aktivität in der hochmolekularen Fraktion ($MW > 4 \times 10^5$) nahe des Ausschlußvolumens nachweisbar. Sie fand sich deutlich abgesetzt von den 7S-Immunglobulinen ($MW < 2 \times 10^5$), womit gezeigt war, daß es sich bei AGF um keinen echten Antikörper gegen denaturiertes Kollagen handeln konnte.

In diesem Zusammenhang wurde auch ein hochmolekularer Faktor auf der Oberfläche von peritonealen Makrophagen beschrieben, der in der Lage war, denaturiertes Kollagen spezifisch zu binden (153). Nach Trypsinbehandlung der Zellen ging das Bindevermögen verloren, konnte aber durch Inkubation mit angereicherten AGF-Fractionen oder Gesamtserum wieder hergestellt werden.

Die Natur von AGF blieb jedoch weiterhin unklar. Im folgenden wird nun über die erstmalige Reindarstellung und Charakterisierung dieses Serumfaktors, sowie über seine Verwandtschaft zu Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) berichtet.

1.1 Reindarstellung von AGF

Die AGF-Aktivität in Serum oder in angereicherten Präparationen wurde mit einem ähnlichen Bindungstest bestimmt, wie er für CIG beschrieben worden war (vgl. Abschnitt VI.2.4). Hierzu wurden die von denaturiertem ^{125}J -Kollagen und AGF gebildeten Assoziante durch Antiserum präzipitiert, das gegen eine angereicherte AGF-Fraktion gerichtet war. Als ein weiteres Testsystem diente ein speziell für AGF entwickelter Makrophagen-Armierungs-Test. Dabei wurden frisch trypsinierte, peritoneale Makrophagen mit AGF-haltigen Fraktionen inkubiert, und auf ihre Fähigkeit, denaturiertes ^{125}J -Kollagen zu binden, geprüft.

Die Anreicherung von AGF erfolgte durch Affinitätschromatographie von Humanserum an immobilisiertem, hitzedenaturiertem, neutralsalzlöslichem Kollagen Typ I aus Kalbshaut bei 4 °C. Für den Gehalt an AGF im Serum erwies sich die Temperatur, bei der die Gerinnung vorgenommen wurde, als außerordentlich wesentlich. In Tab. 18 ist die im Serum mittels Gelatine-Bindungstest gefundene AGF-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur der Gerinnung zusammengestellt.

Unter vergleichbaren Testbedingungen vermochte die gleiche Menge eines bei 4 °C hergestellten Serums im Mittel lediglich 28.1 % des angebotenen, denaturierten ^{125}J -Kollagens zu binden, während der Mittelwert der Aufnahme für das bei 37 °C gewonnene bei 66.7 % lag. Das in der Wärme dargestellte Serum enthielt also einen beträchtlich höheren Anteil an AGF-reaktivem Material als ein in der Kälte gewonnenes.

Temperatur der Serumherstellung	Aufnahme von denaturiertem ¹²⁵ J-Kollagen (%)
------------------------------------	---

4 °C	24.4
	27.0
	33.0
37 °C	64.7
	61.5
	74.1

Tabelle 18 Gelatinebindung von Humanserum. Abhängigkeit der AGF-Aktivität von der Temperatur der Gerinnung

Eingesetzt: je Meßwert 100 ng denaturiertes ¹²⁵J-Kollagen Typ I; 200 µl Serum; Inkubation: 20 Std. bei 4 °C; Präzipitation: durch 200 µl Anti-Human-AGF-Antiserum bei 4 °C, 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis wurde Serum nicht, wie üblich, bei 4 °C, sondern bei 37 °C bereitet.

500 ml Human-ACD-Plasma, das 10000 Einheiten Trasylol enthielt, wurden durch Zugabe von 100 NIH-Einheiten Thrombin, die in 1 ml 0.35M CaCl₂, pH 7.2, gelöst waren, zur Gerinnung gebracht. Nach 12stündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Gerinnsel durch ein Seidentuch abgetrennt. Der Überstand (etwa 350 ml) wurde bei 4 °C auf einer mit 0.05M Tris, 0.1M NaCl, 0.025M EACA, pH 7.6 äquilibrierten Säule von immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert (2.5 x 35 cm) bei einem Durchfluß von 32 ml / Std. chromatographiert. Nach Passage nicht adsorbierter Serumproteine wurde das zurückgehaltene Material mit 1M KBr, pH 5.3 bei 4 °C einstufig desorbiert. Mittels dieses Eluans wurden elektrophoretisch sauberere Rohfraktionen von AGF erhalten als mit 3M KSCN.

In Abb. 41 ist die Verteilung der AGF-Aktivität, bestimmt durch Gelatine-Bindungstest und Makrophagenarmierungstest, auf die bei der Affinitätschromatographie von Serum an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert erhaltenen Fraktionen dargestellt.

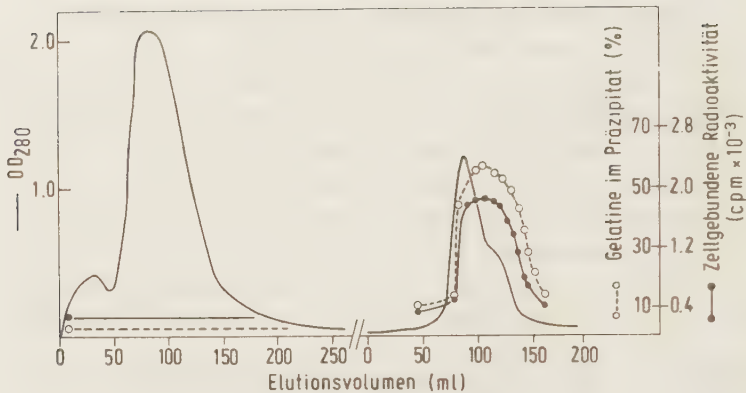


Abb. 41 Zur Affinitätschromatographie von Serum an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert (einstufige Desorption). Lokalisierung der AGF-Aktivität mittels Gelatine-Bindungstest (o-o-o) und Makrophagen-Armierungstest (●-●-●)

Eingesetzt für Gelatine-Bindungstest: je Meßpunkt 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I (konstant); 200 μl der AGF-haltigen Fraktion (konstant); Inkubation: 20 Std. bei 4°C ; Präzipitation: durch 200 μl Anti-Human-AGF-Antiserum bei 4°C , 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

Eingesetzt für Makrophagen-Armierungstest: je Meßpunkt 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I (konstant); 500 μl der AGF-haltigen Fraktion (konstant); Zellzahl: 5×10^6 Zellen pro Meßpunkt. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VIII.1)

Das nicht adsorbierte Material wurde als Gesamtfraction in beiden Testsystemen auf AGF-Aktivität untersucht.

In der mit 1M KBr eluierten Proteinfraction wurde mit beiden Nachweismethoden eine beträchtliche AGF-Aktivität festgestellt, während die nicht adsorbierbare Serumproteinfraction keine Reaktion erbrachte. AGF wird also vollständig von immobilisiertem, denaturiertem Kollagen zurückgehalten und kann mit 1M KBr als angereicherte Fraction desorbiert werden.

Zur Weiterreinigung wurde dieses Material gegen 0.039M Tris-Phosphat, pH 8.6, dialysiert und auf eine im gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Säule (1.5 x 20 cm) gebracht. Die Elution (30 ml / Std.) erfolgte in dem zur Endreinigung von CIG (vgl. Abschnitt IV.2) verwendeten Stufengradienten. Die mit den Pufferstufen p_5 und p_6 erhaltenen Proteinfractionen sowie das Ausgangsmaterial wurden mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Abb. 42 zeigt die elektrophoretischen Trennbilder der Einzelfractionen im Vergleich zu einem CIG-Präparat.

Mit Pufferstufe p_6 (III) wurde ein unter den Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese nahezu einheitlich wanderndes Protein eluiert, dessen elektrophoretische Mobilität der des mitgeführten CIG-Vergleichspräparates (C) entsprach. Nach DTE-Reduktion war nur mehr eine einzige Bande (IIIR) der Beweglichkeit der reduzierten CIG-Untereinheit (CR) festzustellen. Diese Komponente trat im Bandenmuster von Fraction p_5 (II und IIR) nicht auf.

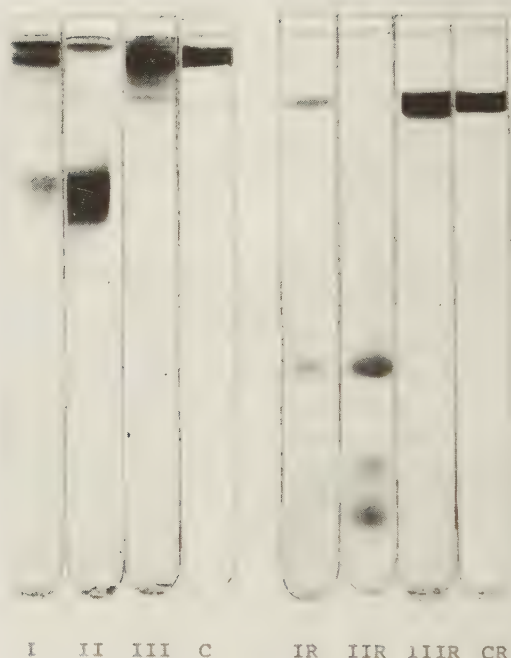


Abb. 42 Zur Reindarstellung von AGF. SDS-Gelelektrophorese von Fraktionen, erhalten durch DEAE-Chromatographie von angereicherten AGF-Präparationen

I : AGF-Rohfraktion, erhalten durch Affinitätschromatographie von Serum an immobilisiertem Kollagen Typ I-denaturiert (einstufige Desorption), Fraktion C, Gesamtmaterial

II : p₅-Fraktion

III: p₆-Fraktion

C : CIG-Vergleichspräparat

5 %ige Gele, 10 Std.; R - Proben nach DTE-Reduktion

Die mit Pufferstufe p₇ erscheinende, mengenmäßig sehr kleine Fraktion wurde nicht berücksichtigt.

Die an DEAE-Cellulose erhaltenen Fraktionen p_5 und p_6 sowie das angereicherte AGF-Präparat vor der Chromatographie wurden nach dem Einengen auf gleiche optische Dichte ($OD_{280}^{1cm} = 1.0$) gebracht und ihre AGF-Aktivität im Gelatine-Bindungstest bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 19 zusammengefaßt.

Pufferstufe	Elutionspuffer		Aufnahme von denat. ^{125}J -Kollagen Typ I (%)
	Tris-Phosphat (M/l)	(pH)	
p_5	0.127	6.2	1.5
p_6	0.220	5.3	62.1
Roh-AGF (ges.)			49.5

Tabelle 19 Zur Reindarstellung von AGF an DEAE-Cellulose. Einzelfraktionen und Gesamtmaterial im Gelatine-Bindungstest

Eingesetzt: je Meßwert 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I; 200 μl je Fraktion ($OD_{280}^{1cm} = 1.0$); Inkubation: 20 Std. bei 4 °C; Präzipitation: durch 200 μl Anti-Human-AGF-Antiserum bei 4 °C, 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

AGF-Aktivität konnte nur in der Fraktion p_6 nachgewiesen werden, während Fraktion p_5 kein zur Gelatine-Bindung befähigtes Material enthielt. Die erhöhte Fähigkeit zur Bindung von denaturiertem ^{125}J -Kollagen Typ I in Fraktion p_6 gegenüber dem Ausgangsmaterial bei gleicher optischer Dichte zeigt eine Anreicherung der AGF-Aktivität in dieser Fraktion an. Mit Fraktion p_5 wurden nicht reaktive Serumproteine offensichtlich quantitativ abgetrennt.

In Abb. 42 war gezeigt worden, daß die mit Pufferstufe p_6 eluierte Fraktion aus einem einheitlich wandernden Protein der elektrophoretischen Beweglichkeit von CIG besteht. In Tab. 19 wurde die gesamte AGF-Aktivität in dieser Fraktion aufgefunden.

Damit ist ein Protein, das sich elektrophoretisch und chromatographisch wie CIG verhält, als AGF-reaktives Material ausgewiesen.

1.2 Charakterisierung von AGF

Im vorhergegangenen Abschnitt war die erstmalige Reindarstellung des Anti-Gelatine-Faktors beschrieben worden. Mit den Experimenten dieses Abschnittes, die mit elektrophoretisch einheitlichem Material durchgeführt wurden, sollen weitere Gemeinsamkeiten beider Proteine erbracht werden.

CIG stellt ein Substrat für aktivierten Gerinnungsfaktor XIII dar und vermag in einer durch diesen Faktor katalysierten Transamidierungsreaktion pro Untereinheit etwa 1 Mol ^{14}C -Putrescin kovalent zu binden (vgl. Abschnitt V.1). Auf diese Fähigkeit wurde auch AGF geprüft.

Dazu wurde AGF unter den für CIG angegebenen Bedingungen (vgl. Abschnitt V.1) mit ^{14}C -Putrescin in Gegenwart von aktiviertem Faktor XIII inkubiert und an DEAE-Cellulose in dem zu seiner und zur Reinigung von CIG beschriebenen abgestuften Gradienten rechromatographiert. Die erhaltene p_6 -Fraktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, ein Gel mit Comassie-Brillant Blue auf Protein angefärbt, ein zweites in Scheiben geschnitten und ihre Einzelradioaktivität bestimmt. In Abb. 43 ist der Verlauf der proteingebundenen Radioaktivität und das gefärbte SDS-Gel dargestellt.

Das elektrophoretische Trennbild zeigte lediglich an einer Stelle proteingebundene Radioaktivität, herrührend vom F XIII_a-katalysierten Einbau des ^{14}C -markierten Amins. Sie war der Bande mit der elektrophoretischen Beweglichkeit der CIG-Untereinheit zuzuordnen. Somit ist nachgewiesen, daß AGF wie CIG zum Einbau von primären Aminen unter Mitwirkung von F XIII_a befähigt ist. AGF stellt somit ein Substrat dieser hochspezifischen Transglutaminase dar.

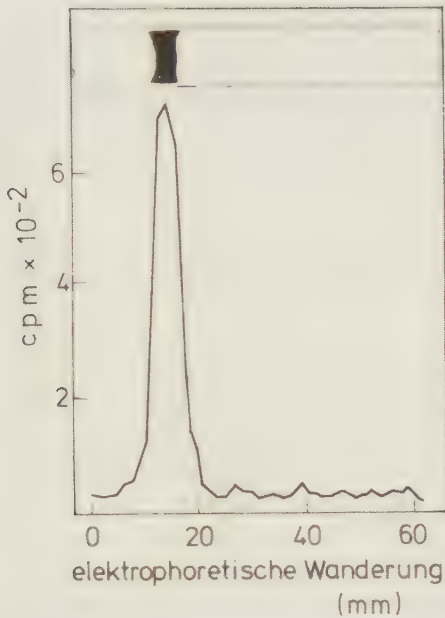


Abb. 43 Verteilung der proteingebundenen Radioaktivität von ^{14}C -Putrescin-markiertem AGF nach SDS-Gelelektrophorese

5 %iges Gel, 10 Std.; Probe DTE-reduziert

In Tab. 20 ist die Aminosäurezusammensetzung von gereinigtem AGF aus Humanserum und von CIG aus Humanplasma gegenübergestellt. Die für beide Proteine erhaltenen Werte zeigten beachtliche Übereinstimmung.

Aminosäure	AGF	CIG
Cys ⁺	3.2	3.8
Asp	9.5	9.5
Ser	9.5	10.0
Thr	9.2	8.8
Glu	13.2	15.3
Pro	5.2	5.0
Gly	9.0	9.1
Ala	5.0	5.1
Val	6.9	7.7
Met	1.1	1.0
Ile	4.0	4.1
Leu	5.3	5.3
Tyr	4.6	3.7
Phe	3.0	2.1
His	2.0	2.1
Lys	4.2	3.0
Arg	5.1	4.4

⁺ analysiert als carboximethyliertes Cystein

Tabelle 20 Aminosäurezusammensetzung von AGF und CIG bestimmt an den vollständig reduzierten und carboximethylierten Untereinheiten

Angaben in Mol pro 1000 Mol Aminosäuren; Tryptophan nicht berücksichtigt;

Diese proteinchemischen Übereinstimmungen wurden durch vergleichende immunologische Untersuchungen mittels Geldiffusion und Immunelektrophorese ergänzt. Abb. 44 zeigt die Geldiffusion nach Ouchterlony und die Immunelektrophorese von AGF und CIG gegen monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum.

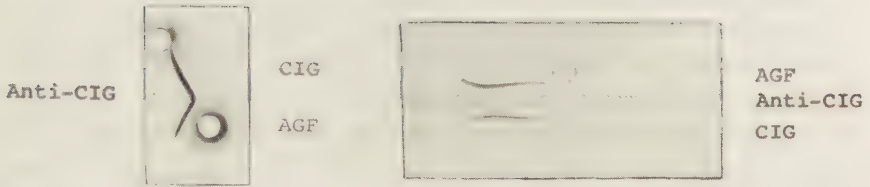


Abb. 44 Vergleich von AGF und CIG durch Geldiffusion (links) und Immunelektrophorese (rechts) gegen monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum

1.3 AGF im Gelatine-Bindungstest

In Abschnitt VI.2.4 war CIG im Bindungstest mit verschiedenen Kollagentypen untersucht worden. Eine Bindung an CIG war dort bevorzugt für Kollagen im denaturierten Zustand nachgewiesen worden. Auch AGF ist in einem vergleichbaren Testsystem in der Lage, denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I zu binden, was bisher zur Bestimmung seiner Aktivität in angereicherten Fraktionen bzw. in Serum herangezogen worden war (vgl. Abschnitt VII.1.1).

An dieser Stelle werden beide Proteine, der Serumfaktor AGF und der Plasmafaktor CIG, im Gelatine-Bindungstest gegenübergestellt. Dabei werden zur Präzipitation der gebildeten Assoziate einerseits Anti-Human-AGF-Antiserum (gerichtet gegen eine AGF-Rohfraktion), andererseits Anti-Human-CIG-Antiserum (gerichtet gegen Rein-CIG) verwendet. Die erhaltenen Bindungskurven sind in Abb. 45 dargestellt.

Beide Faktoren waren als Reinsubstanzen befähigt, denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I zu binden. Es wurde stets ein deutlich sigmoider Verlauf der konzentrationsabhängigen Aufnahme gefunden. Die Immunpräzipitation mit weniger spezifischem Anti-AGF-Antiserum (A) ergab für beide Faktoren etwas voneinander abweichende Kurven mit einem vergleichsweise

niedrigen Maximalwert der Aufnahme an Gelatine. Bei Verwendung von monospezifischem Anti-CIG-Antiserum (B) stieg der Maximalwert an und die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme zeigte für AGF und CIG einen nahezu identischen Verlauf.

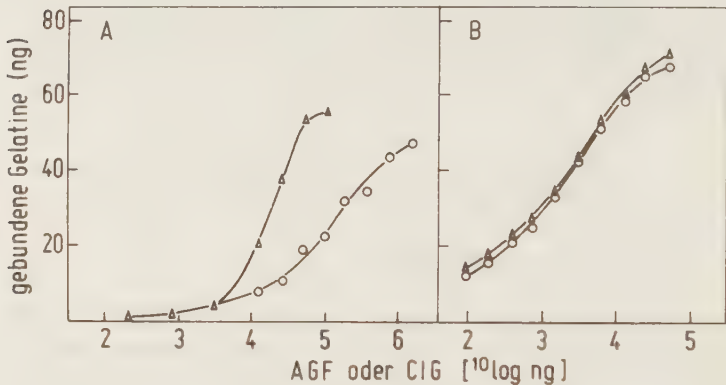


Abb. 45 AGF (o-o-o) und CIG (Δ - Δ - Δ) im Gelatine-Bindungs-test

A: Präzipitation mit Anti-Human-AGF-Antiserum; B: Präzipitation mit Anti-Human-CIG-Antiserum; Eingesetzt: 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I (konstant); 50 μg AGF bzw. CIG in der höchsten Konzentration (Verdünnungsreihe, Zweierstufen); Inkubation: 20 Std. bei 4 °C; Präzipitation: durch 200 μl Antiserum bei 4 °C, 20 Std. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VII.1)

AGF und CIG sind somit vergleichbar gut in der Lage, denaturiertes Kollagen zu binden, wobei die Assoziate sowohl mit Anti-AGF-Antiserum, als auch mit Anti-CIG-Antiserum präzipitiert werden können. Die Abweichung beider Kurvenverläufe in Teil A von Abb. 45 wurde auf die Tatsache zurückgeführt, daß Anti-AGF-Antiserum nach Immunisierung mit einer AGF-Rohfraktion erhalten worden war, die zu Beginn der Untersuchungen zur Verfügung stand.

1.4 Makrophagen-Armierungstest

AGF besitzt, wie eingangs dieses Abschnittes hingewiesen, die Fähigkeit, die Bindung von denaturiertem Kollagen an trypsinierte Makrophagen zu vermitteln. Im Anschluß wird die Wirksamkeit beider Proteine in diesem zur Bestimmung der AGF-Aktivität ausgearbeiteten, zellbiologischen System verglichen. Abb. 46 zeigt die Aufnahme von denaturiertem ^{125}J -Kollagen Typ I durch peritoneale Makrophagen, die nach Trypsinierung mit AGF bzw. CIG behandelt worden waren.

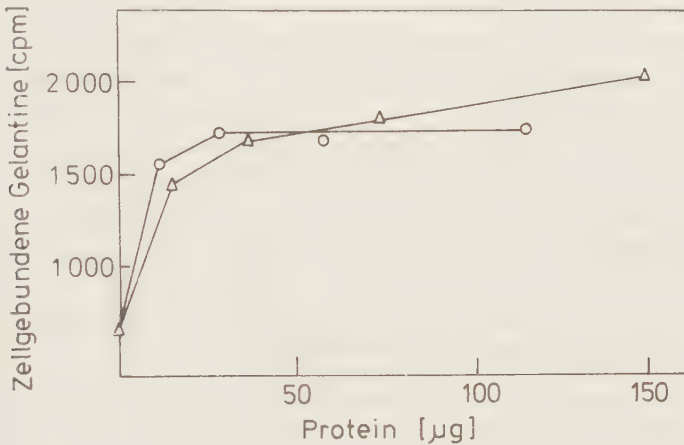


Abb. 46 Bindung von denaturiertem ^{125}J -Kollagen Typ I durch peritoneale Makrophagen, die nach der Trypsinbehandlung mit AGF (o-o-o) und CIG (Δ - Δ - Δ) vorinkubiert worden waren

Eingesetzt: je Meßpunkt 100 ng denaturiertes ^{125}J -Kollagen Typ I (12600 cpm, konstant); 150 μg AGF bzw. CIG in der höchsten Konzentration (Verdünnungsreihe, Zweierstufen); Zellzahl: 5×10^6 Zellen pro Meßpunkt; Armierung: 60 Min. bei Raumtemperatur; Beladung mit ^{125}J -Gelatine: 60 Min. bei Raumtemperatur. Weitere Angaben zum Test im EXPERIMENTELLEN TEIL (vgl. Abschnitt VIII.1)

AGF und CIG besaßen in diesem Testsystem vergleichbare Fähigkeit, die Bindung von denaturiertem ^{125}J -Kollagen Typ I an trypsinierte, peritoneale Makrophagen zu vermitteln. Die beiden Kurven stimmten in Verlauf und Sättigungswert weitgehend überein. AGF scheint somit in diesem Test durch CIG ersetzbar zu sein.

In diesem Abschnitt ist bisher eine enge Verwandtschaft zwischen AGF und CIG aufgezeigt worden. Sie umfaßt ein vergleichbares Bindevermögen für denaturiertes Kollagen Typ I, "komplette Identität" der antigenen Determinenten, gleiche Molekulargewichte, bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese sowohl nach DTE-Reduktion, als auch im unbehandelten Zustand, ein vergleichbares chromatographisches Verhalten an DEAE-Cellulose und nicht zuletzt eine gut übereinstimmende Aminosäurezusammensetzung. Zudem stellen beide Faktoren Substrate für aktivierten Gerinnungsfaktor XIII dar. AGF und CIG sind somit als äußerst ähnliche, wenn nicht identische, Proteine anzusehen.

2. Zur Verwandtschaft von CIG und dem "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)"

Die Bedeutung von Plasma- bzw. Serumproteinen bei der Wechselwirkung mesenchymaler Zellen mit Matrixsubstanzen, besonders beim Anhaften dieser Zellen, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen studiert (104,108,151). Wie im Falle des "Anti-Gelatine-Faktors (AGF)" sind die bisherigen Experimente mit angereicherten Fraktionen durchgeführt worden, in denen die biologisch wirksame Komponente nicht hinreichend charakterisiert ist. In diesem Zusammenhang hat das von Klebe beschriebene "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)", das das Anhaften bestimmter Fibroblastenlinien auf einer Kollagenmatrix vermittelt (151), Bedeutung erlangt. c-CAP ist ein Faktor aus dem Rindersystem, der durch Fällung mit Polyäthylenglycol aus Kälberserum angereichert wurde.

2.1 Charakterisierung von c-CAP

Die hier angeführten Untersuchungen, mit denen Hinweise auf eine starke Ähnlichkeit zwischen c-CAP und CIG erhalten wurden, entstammen einer Zusammenarbeit mit Prof. R.J. Klebe, Dallas, Texas. Sie sind mit von ihm hergestellten c-CAP-Präparaten durchgeführt worden und haben beigetragen, die biologische Aktivität einer Komponente seines Präparates zuzuordnen.

Eine von ihm erhaltene, biologisch wirksame c-CAP-Fraktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei zum Vergleich ein 20 Minuten-Plasminolysegemisch von CIG mitgeführt worden war. Daneben wurde das Präparat der Gel-diffusion und der Immunelektrophorese gegen monospezifisches Anti-Human-CIG-Antiserum unterworfen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abb. 47 dargestellt.

Im hochmolekularen Bereich des elektrophoretischen Trennbildes der c-CAP-Fraktion (I) wurden mindestens vier Banden festgestellt, deren Mobilität mit der von Plasminolyse-Fragmenten von CIG (II) übereinstimmte (Abb. 47, links). Zudem trat eine schwache Bande im Bereich der intakten CIG-Untereinheit auf. Geldiffusion von c-CAP (rechts oben) ergab eine Präzipitationslinie mit dem gegen intaktes CIG gerichteten Antiserum. Sie bog, wie im Falle von AGF, in Form einer Rundung zum Zeichen einer "kompletten Identität" in die von CIG und dem Antikörper gebildete Linie ein. Ein schwach sichtbarer Sporn ist wahrscheinlich auf ein nicht ganz optimales Antigen-Antikörper-Verhältnis bei c-CAP und AGF zurückzuführen. Nach Immunelektrophorese gegen Anti-Human-CIG-Antiserum zeigten c-CAP und CIG je einen Präzipitationsbogen im gleichen elektrophoretischen Bereich. In Abschnitt V.4 war festgestellt worden, daß die frühen hochmolekularen Plasminolyseprodukte von CIG noch die gesamten antigenen Determinanten des nativen CIG besitzen.

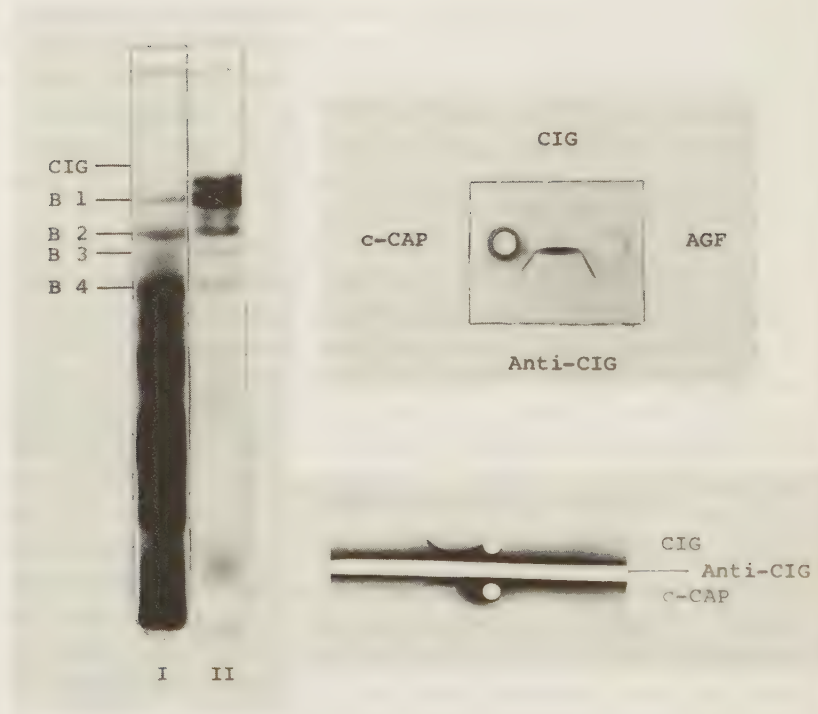


Abb. 47 Zur Charakterisierung einer c-CAP-Fraktion
(von Prof. Klebe, Dallas)

links: SDS-Gelelektrophorese der c-CAP-Fraktion (I) im Vergleich mit einem 20-Minuten-Plasminabbau-Gemisch von CIG (II); 5 %ige Gele, 10 Std.; Proben DTE-reduziert
rechts: Vergleich von c-CAP mit CIG und AGF durch Geldiffusion (oben) und Immunelektrophorese (unten) gegen monospezifisches Anti-CIG-Antiserum

Mit diesen Befunden ist nachgewiesen, daß die c-CAP-Fraktion von Prof. Klebe CIG und seine frühen Plasminolyseprodukte enthält. Um schließlich zu klären, ob CIG den in Klebe's Zellsystem biologisch wirksamen Anteil der c-CAP-Fraktion ausmacht, wurde von mir gereinigtes CIG in USA von Prof. Klebe getestet. Er vermochte zu zeigen, daß das von mir

isolierte Protein mit hoher Aktivität in der Lage war, das Anhaften von Fibroblasten auf einer Kollagenmatrix zu vermitteln. Eine vergleichbar hohe Aktivität wurde für AGF festgestellt, der ebenfalls als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt worden war.

Dem zufolge ist das "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)", wie auch der "Anti-Gelatine-Faktor (AGF)" in die Reihe der CIG-ähnlichen Proteine aufzunehmen ("EINFÜHRUNG", vgl. Abschnitt II.2), wobei die totale Identität aller Faktoren noch nicht restlos geklärt ist.

3. CIG als Haftungs-vermittelnder Faktor für Fibroblasten auf einer Fibrinmatrix

In Abschnitt VII.2 war das "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)" zumindest als CIG-verwandtes Material erkannt worden. Desweiteren war auf die Fähigkeit von CIG und AGF verwiesen worden, das Anwachsen von Fibroblasten auf einer Kollagenmatrix zu vermitteln. Diese Funktionen von CIG und seinen Derivaten ist auf die Affinität zu verschiedenen Kollagentypen zurückzuführen, über die in Abschnitt VI.2 berichtet worden war.

Neben der Wechselwirkung zu Kollagen war im gleichen Abschnitt (vgl. VI.1) eine starke Interaktion von CIG mit löslichem Fibrinmonomer aufgezeigt worden. Die folgenden zellbiologischen Untersuchungen sollen nun klären, inwieweit CIG ein Anhaften von Fibroblasten auch auf Fibrin als Matrix vermitteln kann.

Fötale Fibroblasten aus Humanhaut wurden nach der Trypsinbehandlung in ein Serum-freies, albuminhaltiges Medium gebracht, darin mehrfach gewaschen und zu gleicher Zellzahl auf mehrere, mit löslichem Fibringel ausgekleidete, Petrischalen verteilt ("EXPERIMENTELLER TEIL", vgl. Abschnitt VIII.2). Anschließend wurden verschiedene Komponenten zugesetzt und Anhaftvorgang und Änderung der Morphologie von rund nach spindel-

förmig im Phasenkontrast-Lichtmikroskop studiert. Die detaillierte Versuchsanordnung und die halbquantitative Auswertung ist in Tab. 21 zusammengestellt.

Systemzusammensetzung	Haftung und Spindelform nach	
	3 Stunden	15 Stunden
A-Medium + 100 µg CIG	(+)	-
A-Medium + 100 µg CIG + 50 µg F XIII _a ⁺	+++	(-)
A-Medium + 50 µg F XIII _a ⁺	++	(+)
A-Medium (1. Kontrolle)	-	-
Medium + 10 % FKS (2. Kontrolle)	+++	++++

⁺ aus Faktor XIII-Konzentrat, 85 µg entsprechen der Aktivität von 250 ml Frischplasma; Die Aktivierung erfolgte wie in Abschnitt V.1 beschrieben.

Tabelle 21 Einfluß von CIG auf das Anhaften von Fibroblasten auf frischem Fibringel.

Halbquantitative Auswertung in 4 positiven und einer negativen Stufe unter Berücksichtigung des Anteils der abgesetzten Zellen und des geänderten Phänotyps; Die zugesetzten Komponenten waren jeweils in 150 µl des Albumin-haltigen Mediums (A-Medium) gelöst; die 1. Kontrolle enthielt nur A-Medium, die 2. Kontrolle ein Medium ohne Albumin, dafür jedoch 10 % FKS; FKS = Fötale Kälberserum

Nach 3 Stunden verhielten sich die in Gegenwart von CIG und F XIII_a kultivierten Fibroblasten vergleichbar, wie die zur Kontrolle der Vitalität in Gegenwart von 10 % FKS (2. Kontrolle) kultivierten. In beiden Fällen war, besonders an ausgeprägten Fibrillen und am Gerinnselrand, ein traubenartiges Anhaften und eine Änderung des Phänotyps der Zellen von ursprünglich rund nach spindelförmig gestreckt zu beobachten. Ein ähnliches Verhalten, wenn auch in abgeschwächtem Maß, wurde für die Fibroblasten in Gegenwart von F XIII_a,

und weiter abgeschwächt für die Zellen, die lediglich CIG in ihrer Umgebung hatten, gefunden. Solche, die nur das Albumin-haltige Medium um sich hatten (1. Kontrolle = Blindwert des Experimentes) waren zu diesem Zeitpunkt immer noch nicht abgesetzt und wiesen weiterhin ihre runde Form auf.

Das hier beschriebene, unterschiedliche Verhalten der Fibroblasten gegenüber einer Fibrinmatrix war 4 - 5 Stunden nach ihrer Trypsinierung besonders stark ausgeprägt. Es erwies sich jedoch nach diesem Zeitraum in den Schalen, die kein FKS enthielten, langsam wieder als rückläufig. So waren nach 15 Stunden Kulturdauer lediglich die Zellen der 2. Kontrolle vital und näherten sich langsam dem Zustand der Konfluenz. In allen anderen Schalen hatte sich bereits ein Großteil der Zellen von der Unterlage gelöst und driftete im Medium. Die Fibroblasten der 1. Kontrolle hatten sich in keiner Phase des Experimentes auf dem Fibringel abgesetzt. Vereinfachend sind die Ergebnisse des Fibroblasten-Anheftungstestes auf einer Fibrinmatrix in Tab. 22 dargestellt.

Beobachtetes Kriterium	Zusatz von			
	FKS	CIG	CIG/F XIII _a	F XIII _a
Form	○	○	○	○/◇
Haftung	+	-	+	+/-

A-Medium ohne Zusatz als Kontrolle: Form: ○ ; Haftung: -;

Tabelle 22 Zusammenfassung der Befunde aus dem Fibroblasten-Anheftungstest auf Fibringel (schematisch)

Dieses Experiment, das im Zusammenhang mit der Wirkung von CIG als Haftungs-vermittelnder Faktor für Fibroblasten auf Fibringel als orientierender Versuch gewertet werden muß, läßt den Eindruck entstehen, daß CIG aktivierten Gerinnungsfaktor XIII benötigt, um dieser Funktion nachkommen zu können.

Auf einem über 15 Stunden "gealterten" Fibringel als Matrix ließen sich obige Befunde bestätigen. Allerdings ergab das frisch bereitete Gel bei den verschiedenen Zusätzen die deutlicheren Unterschiede.

E. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte ihren Ausgangspunkt in Untersuchungen über die Plasmaproteine, welche bei der Anreicherung von Fibrinogen aus Plasma als Begleitkomponenten auftreten können. Diese Bestandteile waren, vornehmlich unter Anwendung neu entwickelter chromatographischer Trennsysteme, von Normalfibrinogen abzutrennen und zu charakterisieren. Sie erwiesen sich in der Hauptsache als Derivate von Fibrinogen, daneben wurde auch ein nicht fibrinogenes Plasmaprotein als regelmäßig auftretende Komponente erkannt.

Diese Problemstellung hat zu einer Reihe wesentlicher Ergebnisse geführt. Erstmals wurde ein chromatographisches Trennverfahren entwickelt, mit dem verschiedene Unterfraktionen des Fibrinogens in weitgehend einheitlicher Form aus Rohfibrinogen zugänglich wurden. Nach Abtrennung der Hauptmenge Fibrinogen, wurde aus dem Plasmaüberstand eine weitere Fibrinogenfraktion erhalten. Der entscheidende Schritt in der chromatographischen Fraktionierung von Rohfibrinogen an DEAE-Cellulose bestand im Einsatz eines abgestuften Gradienten, durch den ein Überlappen der einzeln eluierten Fraktionen, wie es bei früher beschriebenen kontinuierlichen Gradienten (141-142) erfolgte, vermieden wurde. Das chromatographische Verfahren ist der Methode der fraktionierten Fällung in verschiedener Hinsicht überlegen. Zum einen stellen die durch Fällung zugänglichen Fibrinogenfraktionen nur angereicherte Gemische verschiedener Derivate dar, zum anderen sind die Ausbeuten an einheitlichem Material gering, ihre Gewinnung jedoch sehr langwierig.

Der Großteil der abgetrennten Derivate wies unvollständige α -Ketten auf, verschiedentlich waren auch verkürzte β - und γ -Ketten nachweisbar. Neben diesen Derivaten, die durch partielle Proteolyse des Mutterproteins entstanden sein dürften, wurde erstmals Evidenz für ein Fibrinogenderivat erbracht, welches kovalent Albumin gebunden trug. Die Verknüpfung beider

Proteine ist offensichtlich durch Disulfid-Austausch, induziert durch die freie Thiolgruppe am Albumin, erfolgt. Durch partielle Reduktion in Abwesenheit von Harnstoff gelang es, aus diesen Derivaten Albumin wieder freizusetzen. Ähnlich Disulfid-verbrückte Komplexe sind von Laurell und Thulin (154) für Bence-Jones-Proteine und α_1 -Antitrypsin, Prealbumin und Albumin im Plasma von Patienten mit Bence-Jones-Proteinuria beschrieben worden. Daneben wird von denselben Autoren über kovalente Assoziate von α_1 -Antitrypsin und Immunglobulin A bzw. Fibrinogen berichtet, die zu etwa 3 % (bezogen auf den Gesamt- α_1 -Antitrypsingehalt) auch im Plasma von Normalspendern auftreten (137). Die Bedeutung dieser Assoziate ist bisher noch vollkommen unbekannt.

In den Rahmen der Experimente, ein geeignetes Trennsystem für Unterfraktionen von Fibrinogen zu finden, wurde auch das Prinzip der Affinitätschromatographie mit einbezogen. Intaktes Fibrinogen und partiell abgebaute Derivate wurden an immobilisiertem Fibrinmonomer unterschiedlich stark adsorbiert. Während intaktes Fibrinogen bei 4 °C erst mit 1M KBr desorbiert wurde, ließen sich die abgebauten Derivate bereits beim Erwärmen der Säule auf 37 °C mit Auftragspuffer eluieren. Offensichtlich sind die äußeren Bereiche der α -Ketten von Fibrinogen zur Wechselwirkung mit Fibrinmonomer befähigt. Eine weitere Haftregion von Fibrinogen zu Fibrinmonomer wurde auf einen kleinen Bezirk innerhalb der γ -Kette eingegrenzt. Interessanterweise liegen beide Haftstellen in räumlicher Nachbarschaft zu den Vernetzungsregionen in α - und γ -Kette. Offensichtlich wird beim Gerinnungsvorgang über diese Bereiche eine Annäherung bzw. Orientierung zweier Fibrinmonomer-Moleküle erreicht, erst dann kann die Quervernetzung durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XIII erfolgen. Durch das unterschiedliche chromatographische Verhalten von Fibrinogen und seinen Derivaten erwies sich die Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer als eine durchaus brauchbare Methode zur Vorfraktionierung von Rohfibrinogen. Zur weiteren Auftrennung wurde die Chromatographie an DEAE-Cellulose im abgestuften Gradientensystem angewandt.

Als neues System, das Fibrinogen oder Fibrinmonomer zu adsorbieren vermochte, wurde immobilisiertes Kollagen erkannt. Die stärkste Affinität wurde zu denaturiertem Kollagen verschiedenen Typs beobachtet. Von den nativen Kollagentypen erwies sich Typ III am wirkungsvollsten, während Typ I keine Affinität zu Fibrinogen besaß. Lösliches Fibrinmonomer wurde dagegen von allen untersuchten Kollagentypen adsorbiert.

Die Affinität zwischen Fibrinogen und Kollagen war deutlich niedriger, als die zwischen Fibrinogen und Fibrinmonomer oder zwischen Fibrinmonomeren untereinander. Von immobilisiertem Kollagen wurde Fibrinogen nur bei 4 °C festgehalten, bei 37 °C hingegen bereits wieder desorbiert. Dennoch erscheint seine Adsorption an immobilisiertes, denaturiertes Kollagen für eine spezifische Anreicherung von Fibrinogen aus Plasma durchaus geeignet.

Vorläufige Befunde aus der Affinitätschromatographie wiesen darauf hin, daß bei der Wechselwirkung von Fibrinogen und Kollagen, wie bei der Wechselwirkung von Fibrinogen und Fibrinmonomer, die äußeren Bereiche der α -Ketten des nativen Moleküls beteiligt sind. Nach Untersuchungen von Timpl und Gollwitzer (22) zeigt diese Region neben einer interchainaren Disulfidschleife einen hohen Gehalt an Prolin und Glycin. Bekanntlich bestehen die helikalen Bereiche des Faserproteins Kollagen (Übersicht siehe 155) zum Großteil aus aneinander gereihten Tripletts der Sequenz Gly-Pro-Hyp. Möglicherweise gibt diese strukturelle Verwandtschaft Anlaß zu den beobachteten Affinitätskräften.

Die Wechselwirkung von Plasmafibrinogen bzw. -Fibrinmonomer mit Kollagen, besonders mit Typ III-nativ, interessiert im Zusammenhang mit der intravascularen Thrombenbildung und der Arteriosklerose. Nach Gay et al. (156) kommt Kollagen Typ III in der Arterienwand unmittelbar unter der Endothelschicht als Bestandteil der Intima vor. Im Falle einer Schädigung bzw. Degeneration der Endothelschicht gelangt im Blut kreisendes Fibrinogen bzw. Fibrinmonomer mit diesem Kollagentyp

in Berührung und wird möglicherweise daran adsorbiert. Interessanterweise erwies sich Kollagen Typ III nach Angaben von Balleisen et al. (157) auch in der Plättchenadhäsion bzw. -aggregation als am wirkungsvollsten. Dieser Vorgang scheint ebenfalls eng vergesellschaftet mit einer Thromben- bzw. Plaquebildung.

Daneben läßt das unterschiedliche Affinitätsverhalten von Kollagen Typ I und III gegenüber Fibrinogen eine Beeinflussung der Fibrillenbildung in-vivo vermuten. Elektronenoptische Aufnahmen von Gewebsschnitten zeigen unterschiedliche Fibrillendicken für beide Kollagentypen, während in-vitro-Experimente zur Fibrillenbildung von hochgereinigtem Kollagen keine signifikanten Unterschiede für beide Kollagentypen ergeben (158).

Nicht zuletzt sind die methodischen Entwicklungen zur Fraktionierung von Plasmafibrinogen unter dem Gesichtspunkt der Suche nach biosynthetischen Vorstufen von Fibrinogen angestellt worden. In diesem Zusammenhang ist auch die partielle Spaltung von Fibrinogen entwickelt worden, bei der sämtliche interchainaren Disulfidbindungen gespalten, jedoch ein Teil der intrachainaren Disulfidschleifen erhalten bleiben. Möglicherweise sind intrachainare Disulfidschleifen die "affinen" Regionen, welche zur Orientierung der fertigen Peptidketten im Zuge des Zusammenlagerns zum Fibrinogenmolekül benötigt werden. Als erster Hinweis für eine verstärkte Interaktion der drei partiell gespaltenen Peptidketten untereinander ist ihre schlechte chromatographische Auftrennung an CM-Cellulose zu werten. Die vollständig reduzierten Fibrinogenketten ließen sich im selben System wesentlich besser auftrennen.

Mittlerweile hat die Methode der partiellen Spaltung unter Erhaltung der intrachainaren Disulfidschleifen bei den Immunglobulinen zu ersten Erkenntnissen in der biosynthetischen Zusammenlagerung der Peptidketten geführt. Sears et al. (159-161) haben in Rekonstitutions-Experimenten mit partiell gespaltenen H- und L-Ketten die wahrscheinliche Reihenfolge des

Molekülaufbaus im Zuge der Biosynthese dieser Spezies ermittelt.

Im Zusammenhang mit biosynthetischen Fragestellungen galt das Interesse bei der Fraktionierung nicht nur Fibrinogen und seinen niedrigmolekularen Derivaten, sondern auch regelmäßig auftretenden höhermolekularen Begleitkomponenten. Aus diesem Grund richtete sich die Aufmerksamkeit auch auf ein nicht fibrinogenes Plasmaprotein in Rohfibrinogenfraktionen, welches dann als das von Mosesson und Umfleet (77) beschriebene "Kälte-unlösliche Globulin (CIG)" erkannt wurde. Ursprüngliche Vermutungen, daß es sich etwa um eine Vorstufe von Fibrinogen handeln könnte, erwiesen sich bald als unzutreffend, nachdem das Protein keine positive Immunreaktion mit Anti-Fibrinogen-Antiserum in der Geldiffusion ergab. Die systematische Identifizierung mittels immunologischer und proteinchemischer Methoden wies diese Komponente als eigenständiges Plasmaprotein aus. Ungeachtet davon macht die Kombination von Affinitätschromatographie und Chromatographie an DEAE-Cellulose die gezielte Suche nach bislang unbekannten Vorstufen von Fibrinogen prinzipiell möglich, doch verspricht die Aufarbeitung foetaler Plasmen oder Leber- und Zellextrakten größere Chancen, ein "Profibrinogen" zu entdecken, als die Fraktionierung von Normalplasmen.

Die Identifizierung von Kälte-unlöslichem Globulin (CIG) als Begleitkomponente von Fibrinogen erfolgte zu einem Zeitpunkt, als Ruoslahti und Vaheri (86-87) den Zusammenhang zwischen diesem Plasmaprotein und einem Oberflächenprotein von Fibroblasten aufzeigten und CIG als die plasmatische Form dieses Oberflächenproteins auswiesen. Diese neu erkannte Stellung von CIG als Brücke zwischen Gerinnungs- und Bindegewebs-system hat eine Reihe neuartiger Fragestellungen im Zusammenhang mit seiner biologischen Funktion aufgeworfen.

Zum Verständnis der biologischen Bedeutung von CIG, zu der bei Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war, sind zunächst einige strukturelle Eigenheiten des Proteins erarbeitet

worden, was seine Reindarstellung in präparativem Maßstab voraussetzte. Das von Mosesson und Umfleet (77) beschriebene Herstellungsverfahren wurde nach Einsatz des zur Fraktionierung von Fibrinogen verwendeten Stufengradienten um den letzten Äthanol-Fällungsschritt verkürzt und die Ausbeute erhöht. Die Kenntnis neuer Affinitätsbeziehungen zu Matrixsubstanzen erlaubte es, die präparative Darstellung von sieben auf drei Stufen zu vereinfachen und die Ausbeute beträchtlich zu verbessern. Nach diesem Verfahren lassen sich auch kleine Plasmaproben auf CIG aufarbeiten.

Ein großer Beitrag zur Erkenntnis der Struktur dieses aus zwei, vermutlich identischen Peptidketten bestehenden Proteins gelang mit dem Abbau durch Plasmin (II). Bereits im Anfangsstadium der Proteolyse sank das Molekulargewicht um die Hälfte ab, während der Restkörper über einen langen Zeitraum unverändert blieb. Diese neuartigen Befunde wurden in der Richtung interpretiert, daß im nativen Molekül alle interchainaren Disulfidbindungen auf einen kleinen Bereich am Ende der Peptidkette konzentriert sind und dieser durch Plasmin leicht abgespalten werden kann. Damit zeigt CIG eine bivalente Struktur ähnlich wie die Histokompatibilitäts-Antigene (162). Bei diesen wurde, zumindest nach Ablösen von der Membran, eine Akkumulation aller interchainaren Disulfidbindungen am C-terminalen Ende der Peptidketten nachgewiesen. Von Molekulargewicht und Struktur erinnert es auch an das Myosin (163), einen Bestandteil vieler kontraktile Elemente.

Die Kenntnis dieser strukturellen Eigenheit macht Ergebnisse früherer Arbeiten über die Ablösung der zellgebundenen Form von CIG verständlich, in denen Molekulargewichte um 2×10^5 für die lösliche Form angegeben wurden (88,96,100-103, 105-106). Da die Zellen meist mit Proteasen behandelt worden waren, erhielten die Autoren lediglich die Untereinheiten, die um das disulfidhaltige Brückenpeptid verkürzt waren. Unter Verwendung von milden Detergenzien in Gegenwart von Harnstoff wurde später intaktes CIG von der Zelloberfläche erhalten (87). Chen et al. (80) gaben nach Veröffentlichung meiner Ergebnisse (I

für den interchainaren Disulfidbereich in der plasmatischen Form eine Länge von 150 Aminosäuren an und bestätigten die kettenendständige Verknüpfung.

Einen besonderen Anstoß bekam die vorliegende Arbeit durch den Befund von Mosher, der CIG als Substrat für aktivierten Gerinnungsfaktor XIII erkannte (78). Es gelang ihm, unter Mitwirkung von F XIII_a Dansylcadaverin kovalent an CIG zu kuppeln. Aus eigenen Experimenten ging hervor, daß pro CIG-Untereinheit 0.76 Mol ¹⁴C-Putrescin eingebaut werden (III). Damit scheint pro Untereinheit eine F XIII-sensitive Region vorzuliegen.

Mit ¹⁴C-Putrescin "lokal" markiertes CIG wurde mit Bromcyan oder Plasmin abgebaut und der radioaktive Ligand jeweils in Bruchstücken vom Molekulargewicht 2.7×10^4 festgestellt (III). Offensichtlich liegt die F XIII-sensitive Region als globuläre Domäne innerhalb jeder Peptidkette vor, die einem weiteren Abbau standzuhalten vermag, solange sie durch Disulfidbindungen in einer bestimmten Konformation gehalten wird.

In Abwesenheit von primären Aminen (auch Tris wird kovalent gekoppelt!) kann, den Angaben von Mosher (78) zufolge, CIG in kovalent vernetzte Oligomere überführt werden. Diese intermolekulare Transamidierungsreaktion wurde in eigenen Experimenten jedoch erst bei relativ unphysiologischen CIG-Konzentrationen ($c > 1$ mg/ml) beobachtet, während der kovalente Einbau von geeigneten primären Aminen auch in sehr verdünnter Lösung ($c < 0.05$ mg/ml) funktionierte. Eine F XIII_a-katalysierte Vernetzung von löslichem Fibrin und CIG wurde nicht gefunden. Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz mit Befunden von Mosher (78,84), der eine direkte Vernetzung beider Substrate durch F XIII_a in Plasma aufzeigte. Fésüs und Laki (164) waren jedoch ebenfalls außerstande, CIG an der Zelloberfläche mit löslichem Fibrin in Gegenwart von F XIII_a kovalent zu vernetzen.

Neben der intermolekularen Vernetzungsreaktion in Abwesenheit von primären Aminen werden möglicherweise andere Veränderungen durch aktivierten Gerinnungsfaktor XIII verursacht. Das in Abschnitt VII charakterisierte CIG-Derivat aus Serum, der sog. "Anti-Gelatine-Faktor (AGF)", lag weitgehend als Monomer vor, obwohl beim Gerinnungsvorgang Faktor XIII mit Sicherheit aktiviert war. Dasselbe gilt für das ebenfalls CIG-verwandte "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)" aus Rinderserum. Möglicherweise läuft die Transamidierungsreaktion intramolekular ab und führt zu einer Schleifenbildung innerhalb der Untereinheit(en). Erste vorläufige Hinweise in dieser Richtung wurden aus einem etwas unterschiedlichen Bromcyan-Peptidmuster von CIG vor und nach F XIII_a-Inkubation erhalten.

Immunologisch gesehen zeigte CIG einige Besonderheiten. So wiesen die Experimente mittels Geldiffusion, in denen die in Gegenwart von Harnstoff reduzierte und carboximethylierte CIG-Untereinheit auf ihre Reaktivität gegenüber dem gegen natives CIG gerichteten Antikörper geprüft wurde, auf größtenteils sequenzielle antigene Determinanten hin, während keine konformationsabhängigen Determinanten festgestellt wurden. Diese Befunde sprechen gegen eine gemeinsame Struktur der beiden Peptidketten, eher für zwei unabhängige, vielleicht sogar frei bewegliche Untereinheiten. Aus immunologischen Untersuchungen an Gemischen, die durch Abbau mit Plasmin und Bromcyan erhalten wurden, ging hervor, daß die Peptide des interchainaren Disulfidkopfes, aber auch das Bruchstück mit der F XIII-sensitiven Region, offensichtlich keine antigenen Determinanten tragen. Diese Ergebnisse wurden mittlerweile von Chen et al. (80) indirekt bestätigt. Sie konnten zeigen, daß im Plasma kreisende natürliche Kataboliten von CIG, deren Molekulargewicht um die Hälfte verkürzt ist, noch alle antigenen Determinanten des Gesamtmoleküls besitzen.

Eine Fähigkeit von CIG, die innerhalb dieser Arbeit besonders untersucht wurde, ist seine Affinität zu Matrixsubstanzen. So wurde mit verschiedenen Methoden eine Affinität

von CIG bevorzugt zu löslichem Fibrin nachgewiesen. Eine deutlich schwächere Wechselwirkung wurde zu seiner globulären Vorstufe, dem Fibrinogen aufgezeigt, solange diese frei, nicht aber immobilisiert vorlag. Qualitative Unterschiede in der Affinität zu CIG stellten auch Stemberger und Hörmann (83) bei der Chromatographie von Plasma an immobilisiertem Fibrinogen fest. Erst als Plasma limitiert mit Thrombin behandelt worden war, wurde CIG zusammen mit Fibrinmonomer vom Säulenmaterial adsorbiert. Nach Angaben von Matthias et al. (149) wird jedoch Fibrinogen bei seiner Immobilisierung über die außen am Molekül liegenden α -Ketten kovalent an die Sepharose geheftet. Gerade Bereiche der Fibrinogen- α -Kette sind nach neuesten Befunden von Stathakis und Mosesson (85) an der Wechselwirkung zwischen CIG und Fibrinogen beteiligt. In den Untersuchungen am immobilisierten Fibrinogen war daher nur eine begrenzte Affinität zu CIG festgestellt worden, obwohl beide Komponenten im freien Zustand dazu befähigt wären.

Im Rahmen dieser Arbeit neu entdeckt wurde die Affinität zwischen CIG und Kollagen (IV, IX-XI). In den Experimenten wurden die verschiedenen Kollagentypen im nativen und denaturierten Zustand als lösliche Präparate eingesetzt. Zum Nachweis der Wechselwirkung diente die Affinitätschromatographie von CIG an immobilisiertem Kollagen, die Beladung von CIG-Sepharose mit ^{125}J -Kollagen, die passive Hämagglutination Kollagen-beladener Erythrocyten durch CIG, sowie ein Proteinbindungstest auf immunologischer Basis, bei dem lösliches ^{125}J -Kollagen mit CIG komplexiert und die gebildeten Assoziate mit Anti-CIG-Antiserum präzipitiert wurden.

Insbesondere der letzte Test, aber auch die Beladung von CIG-Sepharose durch ^{125}J -Kollagen, zeigte, daß CIG bevorzugt mit denaturiertem Kollagen aller drei untersuchten Typen in Wechselwirkung zu treten vermag. Die stärkste Bindung wurde an Typ III denaturiert gefunden, gefolgt von Kollagen Typ II und I mit einer etwas schwächeren Affinität. Von den nativen Kollagentypen war nur der Typ III zur Interaktion mit CIG be-

fähigt, allerdings deutlich schwächer als die verschiedenen denaturierten Formen. Natives Kollagen vom Typ I und II war ganz außerstande, CIG zu binden. In die gleiche Richtung weisen neueste Ergebnisse von Engvall und Ruoslahti (1965), wo eine stärkere Affinität von CIG gegenüber käuflicher Gelatine im Vergleich zu nativem Kollagen Typ III beschrieben wird.

Mit der Methode der Affinitätschromatographie wurde eine ähnliche Abstufung der Wechselwirkung erhalten. Auch hier wurde CIG von immobilisiertem denaturiertem Kollagen Typ I sowie von nativem Kollagen Typ III zurückgehalten, wobei die Affinität zu nativem Typ III geringer war, als zu denaturiertem Typ I. Allerdings zeigte sich in diesen Experimenten auch immobilisiertes natives Kollagen Typ I befähigt, CIG zu adsorbieren. Dieser abweichende Befund ist möglicherweise auf eine partielle Denaturierung des Materials beim Kupplungsvorgang bzw. beim anschließenden Waschen zurückzuführen. Gerade dieses Hybrid von Kollagen-Adsorbens erwies sich als bestens geeignet zur präparativen Darstellung von CIG aus Plasmafraktionen. Offensichtlich liegt das immobilisierte Kollagen bei Einhaltung der angegebenen Vorschrift so weit partiell denaturiert vor, daß es eine Affinität zu CIG erhalten hat, jedoch nicht in der Lage ist, Plasmafibrinogen zu binden. Denaturiertes Kollagen vom Typ III war aufgrund seiner starken Tendenz zur Renaturierung nicht in immobilisierter Form auf seine Wechselwirkung zu CIG untersucht worden.

Die Methode der passiven Hämagglutination war am wenigsten selektiv. Sie ließ keine Abstufung der Wechselwirkung zwischen CIG und Kollagen verschiedener Typen und Formen erkennen.

Verglichen mit den Bindungskräften, die der Fibrinogen-Fibrinmonomer-Interaktion bzw. der Interaktion von Fibrinmonomeren untereinander zugrunde liegen, ist die Wechselwirkung zwischen CIG und den Matrixsubstanzen Fibrin und Kollagen klein.

So wird CIG bei der Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer und an immobilisiertem Kollagen lediglich bei tiefer Temperatur zurückgehalten, und bei 37 °C bereits wieder eluiert. Dennoch dürften diese Affinitäten physiologisch von großer Bedeutung sein, da in biologisch wichtigen Haftvorgängen, z.B. Zellen an Matrixsubstanzen, wo diese Wechselwirkungen zum tragen kommen, stets eine erhebliche Anzahl von Einzelmolekülen beteiligt sind, wodurch die Affinitätskräfte wesentlich verstärkt werden. Kollagen und Fibrin treten außerdem in vivo als wohlgeordnete Fibrillen auf, so daß wegen der Orientierung mehr Haftstellen zur Verfügung stehen, als in den weniger geordneten Zuständen der gelösten oder immobilisierten Form. Eine bemerkenswerte Parallele hierzu ist in der Kollagen-induzierten Aggregation der Blutplättchen zu sehen. Hier erweist sich nur fibrilläres Kollagen als wirksam, gelöstes ruft nur eine minimale Aggregation hervor (157).

Im Zusammenhang mit der neu aufgezeigten Wechselwirkung von CIG zu Matrixsubstanzen, wurde seine Identität mit zwei bis dorthin unvollständig charakterisierten Serumfaktoren festgestellt. Von ihnen war wohl die biologische Wirkung bekannt, doch konnte sie bislang keinem einheitlichen Protein zugeordnet werden.

"Anti-Gelatine-Faktor (AGF)" war ein seit den Fünfzigerjahren beschriebener Serumfaktor mit Affinität zu denaturiertem Kollagen. Ursprünglich wurde AGF als echter Antikörper gegen Gelatine angesehen. Von Wolff et al. (152) wurde jedoch der Beweis erbracht, daß die AGF-Aktivität nicht den 7S-Immunglobulinen zukommt. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnene Kenntnis der Verwandtschaft von CIG und AGF führte zur erstmaligen Reindarstellung und Charakterisierung des Serumfaktors. Demnach besitzen beide Proteine Bindungszentren für Fibrin und Kollagen, übereinstimmende antigene Determinanten, vergleichbare proteinchemische Daten, sowie die Fähigkeit, das Bindungsvermögen trypsinierter peritonealer Exudatzellen für denaturiertes Kollagen wiederherzustellen.

Neben den Haftstellen für die Matrixsubstanzen Fibrin und Kollagen besitzt CIG also auch Bereiche, die von Rezeptoren der Membran solcher phagocytierender Zellen erkannt werden. Sie sind möglicherweise identisch mit den Bezirken, über die CIG auf der Oberfläche von Fibroblasten festgehalten wird. In jedem Falle ist die Vielzahl verschiedener Zelltypen, die CIG auf ihrer Oberfläche tragen, auch auf peritoneale Exudatzellen zu erweitern. In diesem Zusammenhang und aufgrund seiner Affinität zu Fibrin und Kollagen muß diesem Protein wahrscheinlich eine Schlüsselstellung im natürlichen Katabolismus dieser Faserproteine, z.B. bei der Wundheilung, bei rheumatischen Erkrankungen, bei dissaminierter intravasculärer Gerinnung etc. zugestanden werden. Neue Ergebnisse von Colvin und Dvorak (166) sowie von Sherman und Lee (167) deuten darauf hin, daß peritoneale Makrophagen selektiv auch lösliches Fibrin zu binden vermögen und daß das Bindevermögen nach Trypsinbehandlung der Zellen verloren geht. Aufgrund dieser Befunde scheint die Beteiligung des Reticuloendothelialen Systemes (RES) unter Mitwirkung von CIG als Fibrin-bindende Komponente im Katabolismus von Fibrinogen kaum mehr in Frage gestellt.

Als Zelloberflächenprotein wurde CIG auf der Oberfläche von Fibroblasten identifiziert. Es wird von diesen Zellen synthetisiert, gelangt an die Oberfläche und wird im Zuge seines Katabolismus in das umgebende Medium abgegeben. An der Zelloberfläche scheint das Protein das Anhaften der Zellen an einer Matrix zu vermitteln, eine Funktion, die in der dargestellten Affinität zu Matrixsubstanzen begründet ist.

So zeigte die vorliegende Arbeit, daß das von Klebe (151) beschriebene "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)" eine Rohfraktion aus Rinderserum, die das Anhaften von Fibroblasten an partiell denaturierten Kollagenfibrillen vermittelt, als identisch mit CIG und seinen frühen Plasminolyseprodukten ist. Kleinmann et al. (168) grenzten den Bereich in der $\alpha 1$ -Kette von Kollagen Typ I, der beim Haftvorgang beteiligt ist, auf das Bromcyan-Fragment CB-7 ein.

Dessau et al. (169) bestätigten daraufhin diesen Befund durch Inhibition der Interaktion von CIG mit denaturiertem ¹²⁵J-Kollagen durch das gleiche Kollagenbruchstück. Eigene zellbiologische Experimente deuteten an, daß CIG auch das Anhaften von Fibroblasten an einer Matrix aus löslichem Fibrin vermittelt. Um dieser Funktion nachkommen zu können, schien eine "Aktivierung" von CIG durch Gerinnungsfaktor XIII erforderlich.

Normale Fibroblasten produzieren eine Matrix aus CIG, Kollagen und Proteoglycanen, die ihr Anhaften gewährleistet. Das Anhaften an Matrixsubstanzen wie Fibrin und Kollagen ist nämlich eine wichtige Voraussetzung für die Ansiedlung dieser Zellen z.B. in einem Wundgebiet, für ihr Überleben und ihre Syntheseleistung. Es führt in den ersten Stadien der Wundheilung zur Kontraktion des die Wunde verschließenden Fibringerinnsels, möglicherweise des gesamten Wundgewebes (170).

Die Befunde zum Anhaften von Fibroblasten an Fibrin-gelen lassen auf eine Beteiligung von CIG und offensichtlich auch von aktiviertem Gerinnungsfaktor XIII schließen. Der Mitwirkung von F XIII_a beim Haftvorgang an einer Fibrinmatrix ist deswegen physiologische Bedeutung beizumessen, weil seit geraumer Zeit bekannt ist, daß diesem Gerinnungsfaktor über die Vernetzung von Fibrin hinaus eine wesentliche, bislang jedoch noch nicht verstandene Wirkung innerhalb der Wundheilung zukommt. Patienten mit kongenitalem F XIII-Mangel leiden an schlecht heilenden Wunden mit stark gestörter Narbenbildung (69). Aus Arbeiten von Beck et al. (171) geht hervor, daß Fibroblasten in F XIII-armer Umgebung schlecht an der Matrix anwachsen und nur wenig frisches Bindegewebe produzieren. Ursprünglich wurde vermutet, daß dem am Ort der Wunde gebildeten Fibringerinnsel lediglich die mechanische Verfestigung durch Quervernetzungen fehlt, so daß es seine Matrixfunktion gegenüber einsprossenden Fibroblasten nur ungenügend erfüllen kann. Ein anderer Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang wäre durch das erschwerte Anhaften der Zellen aufgrund der mangelhaften "Aktivierung" von zellgebundenem CIG gegeben.

In der Tat scheint von verschiedenen aktivierten Serumfaktoren eine bislang wenig beachtete zelluläre Wirkung auszugehen, wodurch Zellen stimuliert und zur Mitose angeregt werden können. So zeigten Chen und Buchanan (172), daß Thrombin ruhende, embryonale Hühnerfibroblasten zur DNS-Synthese und damit zur Vermehrung bringt. Eine mitogene Wirkung wurde auch bei verschiedenen anderen Proteasen wie Trypsin, Pronase, Ficin etc. beschrieben (117-118,173). Chymotrypsin hingegen scheint ruhende Fibroblasten nicht zu aktivieren.

Untersuchungen über den Mechanismus der Stimulierung des Zellwachstums durch humorale Faktoren richten sich vor allem auf Substrate an der Zelloberfläche, unter ihnen CIG. Seine steuernde Funktion und die damit verbundene biologische Bedeutung geht vor allem aus Experimenten mit Virus-transformierten Zelllinien hervor. Nach Transformierung (Übersicht siehe 113) wird CIG nämlich nicht mehr oder in wesentlich geringerer Menge an der Zelloberfläche gefunden. Parallel mit dem Fehlen dieses Oberflächenbestandteils nimmt nach Untersuchungen von Chen et al. (120) die Fähigkeit zur Induzierung von Tumoren in Wirtsorganismen signifikant zu. Angaben von Vaheri und Ruoslahti (100) zufolge liegt die Ursache für das Verschwinden von CIG weniger in einer verringerten Syntheserate, als daß diesen Zellen vielmehr die Fähigkeit fehlt, CIG an ihrer Oberfläche zu behalten. Demgegenüber stehen Befunde von Adams et al. (112), aus zellfreien Systemen die dennoch auf eine reduzierte CIG-Synthese nach Transformation hinweisen.

Aufgrund dieser Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit sind Morphologie und Wachstumsverhalten dieser Zelllinien stark geändert. So zeigen transformierte Zellen eine verminderte Neigung zum Anhaften an verschiedenen Substraten, d.h. die Bereitschaft zum Zell-Matrix-Kontakt. Es schließen sich Veränderungen im cytoskeletalen System der Zelle an, womit die Änderung des Phänotyps von rund nach spindelförmig gestreckt nicht mehr gewährleistet ist. Normale Zellen scheinen in Monolayer-Kultur durch eine interzelluläre CIG-Matrix

über ein Werk von Mikrofilamenten und Pseudopodien untereinander verbunden. Dieser Zell-Zell-Kontakt steht offensichtlich im Zusammenhang mit der Fähigkeit von normalen Zellen zur Kontaktinhibition, d.h. des Abbruchs des Wachstums der Zelle bei gegenseitiger Berührung. Nach Transformation geht diese Fähigkeit der Wachstumskontrolle ganz oder zumindest teilweise verloren. Hinzu kommt eine erhöhte Agglutinierbarkeit transformierter Zellen durch pflanzliche Lectine, sowie der Verlust der Fähigkeit zur Gerinnselretraktion (174).

Normale Fibroblasten weisen nach Behandlung mit Proteasen und bestimmten Lectinen ein in verschiedenen Punkten den transformierten Zellen ähnliches Verhalten auf. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Fehlverhalten dieser Zelllinien mit der Veränderung von CIG an der Zelloberfläche einhergeht. Tatsächlich korrigiert nach Angaben von Yamada et al. (123-124) sowie Ali et al. (114) ein Zusatz von CIG ins Medium von Virus-transformierten Zelllinien weitgehend ihren Phänotyp und ihr Wachstumsverhalten. Sie erlangen auf diese Weise ihre ursprünglich spindelförmige Gestalt und ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition wieder. In Gegenwart von Anti-CIG-Antikörpern treten die Merkmale der Transformation wieder hervor (114,124).

Unkeless et al. (121-122) haben in Kulturen transformierter Zelllinien eine erhöhte proteolytische Aktivität, herührend von Plasminogen-Aktivator, nachgewiesen. Er könnte entweder selbst, oder über die Aktivierung anderer Proteasen, eine ständige Ablösung von zellgebundenem CIG bewirken. Damit würden sich Tumorzellen im Zustand stetiger Anregung befinden. Die verstärkte Proteasenaktivität der Tumorzelle bewirkt eine anhaltende Degradation der Umgebung, so daß die Matrixfunktion von Bindegewebe und Basalmembranen zunichte gemacht wird (175). In-vivo führt dieses andauernde assoziale Wachstum dann zu malignen Wucherungen und Tumoren.

Dieser pathologischen Situation recht nahe stehend erscheinen die Vorgänge, die zur Proliferation von Zellen im

Zuge der Wundheilung beitragen. Innerhalb der katabolen Phase wird unter Freisetzung lysosomaler Proteasen und -aktivatoren ebenfalls eine proteolytische Atmosphäre im Wundfeld erzeugt, der innerhalb der anabolen Phase eine gesteigerte zelluläre Aktivität folgt. Im Bereich der Wunde unterliegen all diese Vorgänge offensichtlich strengen Kontrollmechanismen, welche bei der Tumorgenese aus bisher ungeklärter Ursache gestört sind.

Die Zusammenhänge innerhalb der Zellaktivierung durch humorale Faktoren sind bislang nicht ganz eindeutig. So wird nach Teng und Chen (173) sowie Blumberg und Robbins (106) CIG an der Zelloberfläche durch Thrombinbehandlung nicht verändert, obwohl dieser Gerinnungsfaktor stark mitogen wirkt. Dagegen finden Mosher und Vaheri (176) in Übereinstimmung mit Pohjanpelto (177), daß nach Thrombinbehandlung der Zellen CIG sowohl an der Oberfläche als auch gelöst im Medium vermindert vorkommt. Chymotrypsin wurde als Protease erkannt, die zellgebundenes CIG abbaut, ohne aber mitogene Wirkung zu entwickeln (173). Ähnliche Beobachtungen werden von Zetter et al. (178) für Papain und Thermolysin beschrieben.

Unter diesen Gesichtspunkten wird man der zellgebundenen wie der löslichen Form von CIG als Substrat verschiedener Proteasen und aktivierter Gerinnungsfaktoren zweifellos eine steuernde Rolle innerhalb der Zell-Zell bzw. der Zell-Matrix-Interaktionen einräumen müssen, wenn gleich die regulatorischen Prinzipien im Augenblick nur unvollständig zu erkennen sind.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Dissertation setzt sich aus zwei Abschnitten zusammen: der erste, der auch die Ergebnisse der Diplomarbeit beinhaltet, befaßt sich mit Fibrinogen, der gerinnbaren Komponente des Blutplasmas, und seinen natürlich vorkommenden Derivaten. Im Mittelpunkt des zweiten Abschnittes steht ein nicht gerinnbares Begleitprotein von Fibrinogen, das "Kälte-unlösliche Globulin (CIG)".

Der erste Abschnitt enthält Untersuchungen zur chromatographischen Fraktionierung von Fibrinogen. Dabei ist es erstmals gelungen, die Heterogenität von Plasmafibrinogen in einem chromatographischen Trennsystem aufzuzeigen und frühe, natürlich vorkommende Abbauprodukte vom intakten Mutterprotein abzutrennen.

Unter den Begleitkomponenten von Normalfibrinogen wurde auch ein Fibrinogenderivat nachgewiesen, das durch kovalente Vereinigung eines partiell abgebauten Fibrinogens mit Albumin, offensichtlich über Disulfidaustausch, entstanden ist. Das gebundene Albumin wurde durch milde Reduktion der entsprechenden Disulfidbindung(en) abgetrennt und charakterisiert.

Daneben wurde eine weitere Variante der partiellen Spaltung von Disulfidbindungen im Fibrinogen ausgearbeitet. In 8M Harnstoff bei schwach saurem pH-Wert erfolgte im Fibrinogen eine Spaltung sämtlicher interchainarer Disulfidbrücken. Es blieben jedoch etwa 6 intrachainare Disulfidschleifen erhalten. Unter denselben Reduktionsbedingungen blieben im Serumalbumin etwa 3 der 17 Disulfide ungespalten.

Zur Fraktionierung von Fibrinogen wurde auch das Prinzip der Affinitätschromatographie an immobilisiertem Fibrinmonomer miteinbezogen. Für die Wechselwirkung beider Komponenten erwies sich neben den äußeren Bereichen der α -Ketten

vor allem eine Region als bedeutsam, die nach Plasminolyse von Fibrinogen in Fragment D erscheint. Diese Haftstelle wurde auf ein relativ kurzes Teilstück nahe dem C-Terminus der γ -Kette eingegrenzt, das einer Teilfraktion von Fragment D angehört. Sie ist offensichtlich komplementär zu einem Haftzentrum im Mittelteil des Fibrinogen-Moleküls, welches durch Thrombin aktivierbar ist.

In verschiedenen angereicherten Fibrinogenfraktionen trat ein hochmolekulares, nicht-fibrinogenes Begleitprotein auf, welches schließlich als "Kälte-unlösliches Globulin (CIG)" identifiziert wurde. Zum gleichen Zeitpunkt wurde diese Komponente von einer finnischen Arbeitsgruppe als die plasmatische Form eines Oberflächenproteins von Fibroblasten erkannt. Dieser neue Gesichtspunkt war der Auslöser einer Reihe von neuartigen Fragestellungen, die Gegenstand der Untersuchungen im zweiten Abschnitt dieser Dissertation wurden.

Zunächst wurde die präparative Darstellung von CIG ausgearbeitet. Es schlossen sich proteinchemische und immunologische Untersuchungen zu seiner Struktur an. Sie ergaben, daß CIG aus zwei identischen Untereinheiten vom Molekulargewicht 2.2×10^5 besteht, die, wie aus dem zeitlichen Verlauf der Plasminolyse hervorging, nur an ihrem Ende durch Disulfidbrücken verknüpft sind. In einer durch Gerinnungsfaktor XIII^a-katalysierten Transamidierungsreaktion wurden 0.76 Mol ^{14}C -Putrescin pro 2.2×10^5 Gramm CIG kovalent eingebaut, was mit dem Vorliegen je eines reaktiven Zentrums in jeder CIG-Untereinheit gedeutet wurde.

Der Abbau des ^{14}C -Putrescin-markierten Proteins mit Bromcyan oder mit Plasmin ergab jeweils Bruchstücke vom Molekulargewicht 2.7×10^4 , in denen die durch den Liganden eingeführte, proteingebundene Radioaktivität lokalisiert war. Nach vollständiger Reduktion und Carboximethylierung wurde ein fortschreitender Abbau durch Bromcyan festgestellt.

Immunologische Untersuchungen wiesen darauf hin, daß die antigenen Determinanten im CIG vorwiegend sequenzieller Natur und nicht konformationsabhängig sind. Sie schienen auf einen relativ kurzen Bereich der CIG-Untereinheit lokalisiert.

Erstmals wurden Wechselwirkungen zwischen CIG und den Matrixsubstanzen Fibrin und Kollagen aufgezeigt. Als Testsysteme wurden die Methode der Affinitätschromatographie, die Technik der passiven Hamagglutination, ein Sepharose-Beladungstest und ein radio-immunologischer Protein-Bindungstest herangezogen. Diese Untersuchungen ließen eine starke Affinität von CIG zu löslichem Fibrin, weniger jedoch zu seiner löslichen Vorstufe, dem Fibrinogen, erkennen. Weiterhin wurde eine unterschiedlich starke Wechselwirkung zu den einzelnen Kollagentypen, die besonders nach Hitzedenaturierung eine verstärkte Affinität zeigten, beobachtet. Die Bindungsfähigkeit für CIG nahm in der Reihenfolge Kollagen Typ III-denaturiert > Typ II-denaturiert = Typ I-denaturiert » Typ III-nativ > Typ II-nativ = Typ I-nativ ab.

Im Rahmen der Affinitätsstudien wurde erstmals auch eine beachtliche Affinität von Fibrinogen und von löslichem Fibrinmonomer zu Kollagen Typ I-denaturiert und Typ III-nativ erkannt, während Typ I in der nativen Form nur lösliches Fibrinmonomer zu binden vermochte. Die Wechselwirkung Fibrinogen / Kollagen stellte sich gegenüber der Wechselwirkung Fibrinogen / Fibrinmonomer als deutlich schwächer heraus. Erste Befunde wiesen darauf hin, daß bei der Fibrinogen / Kollagen-Interaktion die äußeren Bereiche der α -Ketten von Fibrinogen beteiligt sind.

Die Kenntnis der erwähnten Affinitätsbeziehungen führte zu einer neuen, wesentlich vereinfachten Reindarstellung von CIG durch Adsorption von Plasmafraktionen an immobilisiertem Kollagen Typ I-nativ, das durch KSCN-Behandlung aktiviert worden war. Nach demselben Verfahren gelang es leicht, präparativ Fibrinogen von begleitenden CIG zu befreien.

Auf der Suche nach der biologischen Relevanz dieser biochemisch nachweisbaren Adsorptionsphänomene wurde ein bislang unvollständig charakterisierter Serumfaktor, der die Bindung von denaturiertem Kollagen an Makrophagen vermittelt, der sog. "Anti-Gelatine-Faktor (AGF)", als CIG-verwandtes Material erkannt. Diese Ähnlichkeit führte zu seiner erstmaligen Reindarstellung sowie zu seiner proteinchemischen und immunologischen Charakterisierung.

CIG und dessen frühe Abbauprodukte waren auch in einer angereicherten Fraktion des sog. "Collagen-dependent Cell-Attachment Protein (c-CAP)", ein Faktor, der das Anhaften von Fibroblasten auf einer Kollagenmatrix vermittelt, nachweisbar. Gereinigtes CIG und AGF vermochten den aktiven Faktor im Testsystem zu ersetzen. Ebenso zeigte CIG, zumindest in Gegenwart von aktiviertem Gerinnungsfaktor XIII, die Befähigung, das Anhaften von Fibroblasten auf einem Fibringel zu vermitteln.

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf ihre Bedeutung bei Wundheilung und Tumorgenese diskutiert.

G. LITERATUR

1. Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L. jr., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M. und Taylor, H.L. (1946) J. Am. Chem. Soc. 68, 459
2. Cohn, E.J., Gurd, F.R.N., Surgenor, D.M., Barnes, B.A., Brown, B.A., Derouaux, G., Gillespie, J.M., Kahnt, F.W., Lever, W.F., Liu, C.H., Mittelman, D., Mouton, R.F., Schmid, K. und Uroma, K. (1950) J. Am. Chem. Soc. 72, 465
3. Doolittle, R.F. (1973) Adv. Prot. Chem. 27, 1
4. Hall, C.E. und Slayter, H.S. (1959) J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 11
5. Bachmann, L., Schmitt-Fumian, W., Hammel, R. und Lederer, K. (1974) Die Makromolekulare Chemie 176, 2603
6. Lederer, K. und Hammel, R. (1974) Die Makromolekulare Chemie 176, 2619
7. Lederer, K. (1975) Die Makromolekulare Chemie 176, 2641
8. Bettelheim, F.R. und Bailey, K. (1952) Biochim. Biophys. Acta 9, 578
9. Lorand, L. und Middlebrook, W.R. (1952) Biochem. J. 52, 196
10. Blombäck, B. und Yamashina, I. (1958) Arkiv Kemi 12, 299
11. McKee, P.A., Rogers, L.A., Marler, E. und Hill, R.L. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 116, 271
12. Lottspeich, F. und Henschen, A. (1977) Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 358, 935
13. Doolittle, R.F., Cassman, K.G., Cottrell, B.A., Friezner, S.J., Hucko, J.T. und Tagaki, T. (1977) Biochemistry 16, 1703
14. Doolittle, R.F., Cassman, K.G., Cottrell, B.A., Friezner, S.J. und Tagaki, T. (1977) Biochemistry 16, 1710
15. Doolittle, R.F., Cassman, K.G., Cottrell, B.A. und Friezner, S.J. (1977) Biochemistry 16, 1715

16. Marder, V.J., Budzynski, A.Z. und James, H.L. (1972)
J. Biol. Chem. 15, 4775
17. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L. und McKee, P.A.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 636
18. Henschen, A. (1962) Acta Chem. Scand. 16, 1037
19. Budzynski, A.Z. und Stahl, M. (1969) Biochim. Biophys.
Acta 175, 282
20. Blombäck, B., Blombäck, M., Henschen, A., Hessel, B.,
Iwanaga, S. und Woods, K.R. (1968) Nature 218, 130
21. Gårdlund, B., Kowalska-Loth, B., Gröndahl, N.J. und
Blombäck, B. (1972) Thromb. Res. 1, 371
22. Timpl, R. und Gollwitzer, R. (1973) FEBS Lett. 29, 92
23. Nakamura, S., Iwanaga, S. und Suzuki, T. (1974) Biochim.
Biophys. Acta 336, 86
24. Blombäck, B. und Blombäck, M. (1956) Arkiv Kemi 10, 415
25. Lipinska, I., Lipinski, B. und Gurewich, V. (1974)
J. Lab. Clin. Med. 84, 509
26. Shainoff, J. und Page, I.H. (1962) J. Exp. Med. 116, 687
27. Ströder, W. und Hörmann, H. (1974) Biochim. Biophys. Acta
351, 396
28. Ströder, W. und Hörmann, H. (1974) Hoppe-Seyler Z. Phy-
siol. Chem. 355, 776
29. Mosesson, M.W. und Sherry, S. (1966) Biochem. 5, 2829
30. Wuppermann, Th. und Hörmann, H. (1971) Hoppe-Seyler Z.
Physiol. Chem. 352, 1171
31. Wuppermann, Th., von Rosen, G. und Hörmann, H. (1971)
Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 352, 1727
32. Jilg, W. und Hörmann, H. (1974) Hoppe-Seyler Z. Physiol.
Chem. 355, 1316
33. Jilg, W., Prieß, H. und Hörmann, H. (1976), Thromb. Res.
9, 479

34. Mosesson, M.W., Finlayson, I.S., Umfleet, R.A. und Galanakis, D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5210
35. Sherman, L.A., Mosesson, M.W. und Sherry, S. (1969) Biochem. 8, 1515
36. Gollwitzer, R., Hafter, R., Timpl, R. und Graeff, H. (1977) Thromb. Res. 11, 859
37. Robbins, K.C. und Ogston, D. in "Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology", Kapitel X und XI, Verlag John Wiley and Sons (1977)
38. Haimburger, N. und Trobisch, H. (1971) Angew. Chem. 83, 89
39. Marder, V.J., Shulman, N.R. und Carroll, W.R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2111
40. Pizzo, S.V., Taylor, L.M., Schwartz, M.L., Hill, R.L. und McKee, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4581
41. Budzynski, A.Z., Marder, V.J. und Shainoff, J.R. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2294
42. Niléhn, J.E. (1967) Thromb. Diath. Haemorrh. 18, 487
43. Smith, G.F. und Bang, N.U. (1972) Biochem. 11, 2958
44. Mosesson, M.W., Alkjaersig, N., Sweet, B. und Sherry, S. (1967) Biochem. 6, 3279
45. Hudry-Clergeon, G., Marguerie, G., Pouit, L. und Sussillon, M. (1975) Thromb. Res. 6, 533
46. York, L.L. und Blombäck, B. (1976) Thromb. Res. 8, 607
47. Porter, K.R. und van Zandt Hawn, C. (1949) J. Exp. Med. 90, 225
48. Shulman, S., Katz, K. und Ferry, J.D. (1953) J. Gen. Physiol. 36, 759
49. Donnelly, T.H., Laskowski, M. jr., Notley, N. und Scheraga, H.A. (1955) Arch. Biophys. Biochem. 56, 369
50. Gollwitzer, R., Karges, H.E., Hörmann, H. und Kühn, K. (1970) Biochim. Biophys. Acta 207, 445

51. Lorand, L. (1950) Nature 166, 694
52. Chen, R. und Doolittle, R.F. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 420
53. Domanik, R.A. (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 219
54. Takagi, T. und Iwanaga, S. (1970) Biochem. Biophys. Res. Comm. 38, 129
55. Loewy, G., Matakic, S. und Darnell, J.H. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 113, 435
56. Pisano, J., Finlayson, J.S. und Peyton, M.P. (1966) Biochemistry 8, 871
57. Lorand, L., Downey, J., Gotoh, T., Jacobsen, A. und Tokura, S. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 222
58. Lorand, L. und Ong, H.H. (1966) Biochemistry 5, 1747
59. Lorand, L., Ong, H.H., Lipinski, B., Rule, N.G., Downey, J. und Jacobsen, A. (1966) Biochem. Biophys. Res. Comm. 25, 629
60. Lorand, L. und Campell, L.K. (1971) Anal. Biochem. 44, 207
61. Laki, K. (1972) "The biological role of the clot-stabilizing enzyme: Transglutaminase and Factor XIII" Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 1
62. Schwartz, M.L., Pizzo, S.V., Hill, R. und McKee, P.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5851
63. Lorand, L. und Konishi, K. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 105, 58
64. Schwartz, M.L., Pizzo, S.V., Hill, R. und McKee, P.A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1395
65. Curtis, C.G., Stenberg, P., Chou, C.-H.J., Gray, A., Brown, K. und Lorand, L. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 51
66. Takagi, T. und Doolittle, R.F. (1974) Biochemistry 13, 750

67. Bohn, H. (1970) Thromb. Diath. Haemorrh. 23, 455
68. Bohn, H. (1972) Ann. N.Y. Acad. Sci. 202, 256
69. Duckert, F., Jung, E. und Shmerling, D.H. (1960) Thromb. Diath. Haemorrh. 5, 179
70. Losowsky, M.S., Hall, R. und Goldie, W. (1965) Lancet 2, 156
71. Fisher, S., Rikover, M. und Naor, S. (1966) Blood 28, 34
72. Ogston, D. und Bennett, B. in "Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Pathology", Kapitel IX und XII, Verlag John Wiley and Sons (1977)
73. Morrison, P.R., Edsall, J.T. und Miller, S.G. (1948) Amer. Chem. Soc. 70, 3103
74. Edsall, J.T., Gilbert, G.A. und Sheraga, H.A. (1955) Amer. Chem. Soc. 77, 157
75. Murray, M. und Huseby, R.M. (1967) Biochem. Med. 1, 15
76. Pollara, B., Ph.D. Thesis, University of Minnesota 1963, University Microfilm 63-7948, Ann Harbor, Michigan (1963)
77. Mosesson, M.W. und Umfleet, R.A. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5728
78. Mosher, D.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6614
79. Mosesson, M.W., Chen, A.B. und Huseby, R.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 386, 509
80. Chen, A.B., Amrani, D.L. und Mosesson, M.W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 493, 310
81. Fyrand, O. und Solum, N.O. (1976) Thromb. Res. 8, 659
82. Bang, N.U., Hansen, M.S., Smith, G.F. und Mosesson, M.W. (1973) Thromb. Diath. Haemorrh. 56, 76
83. Stemberger, A. und Hörmann, H. (1976) Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 357, 1003
84. Mosher, D.F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1639
85. Stathakis, N.E. und Mosesson, M.W. (1977) J. Clin. Invest. 60, 855

86. Ruoslahti, E. und Vaheri, A. (1975) J. Exp. Med. 141, 497
87. Ruoslahti, E. und Vaheri, A. (1974) Nature 248, 790
88. Ruoslahti, E., Vaheri, A., Kuusela, P. und Linder, E. (1973) Biochim. Biophys. Acta 322, 352
89. Mosher, D.F. (1977) Biochim. Biophys. Acta 491, 205
90. Keski-Oja, J., Mosher, D.F. und Vaheri, A. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 699
91. Keski-Oja, J., Mosher, D.F. und Vaheri, A. (1977) Cell 9, 29
92. Vaheri, A., Ruoslahti, E., Westermark, B. und Pontén, J. (1976) J. Exp. Med. 143, 64
93. Chen, L.B., Maitland, P.H. und McDougall, J.K. (1977) Exp. Cell Res. 106, 39
94. Hynes, R.O., Martin, G.S., Shearer, M., Critchley, D.R. und Epstein, C.J. (1976) Dev. Biol. 48, 35
95. Muir, L., Bornstein, P. und Ross, R. (1976) Eur. J. Biochem. 64, 105
96. Hynes, R.O. und Bye, J.M. (1974) Cell 3, 113
97. Gahmberg, C.G. und Hakomori, S. (1974) Biophys. Biochem. Res. Comm. 59, 283
98. Stenman, S., Wartiovaara, J. und Vaheri, A. (1977) J. Cell Biol. 74, 453
99. Gahmberg, C.G., Hayry, P. und Andersson, L.C. (1976) J. Cell Biol. 68, 642
100. Vaheri, A. und Ruoslahti, E. (1974) Int. J. Cancer 13, 579
101. Ruoslahti, E. und Vaheri, A. (1976) Immunochemistry 13, 639
102. Hogg, N.M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 489
103. Yamada, K.M. und Weston, J.A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3492

104. Pearlstein, R. (1976) Nature 262, 497
105. Gahmberg, C.G., Kiehn, D. und Hakomori, S. (1974)
Nature 248, 413
106. Blumberg, P.M. und Robbins, P.W. (1975) Cell 6, 137
107. Sear, C.H.J., Grant, M.E. und Jackson, D.S. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 379
108. Grinnell, F. (1976) Exp. Cell Res. 102, 51
109. Hynes, R.O. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3170
110. Gahmberg, C.G. und Hakomori, S. (1973) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 70, 3329
111. Vaheri, A. und Ruoslahti, E. (1975) J. Exp. Med. 142,
530
112. Adams, S.L., Sobel, M.E., Howard, B.H., Olden, K.,
Yamada, K.M., de Crombugghe, B. und Pastan, I. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3399
113. Hynes, R.O. (1976) "Cell surface Proteins and Malignant
Transformation". Reviews on Cancer. Biochim. Biophys.
Acta 458, 73
114. Ali, I., Mautner, V., Lanza, R. und Hynes, R.O. (1977)
Cell 11, 115
115. Burger, M.M. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 994
116. Inbar, M. und Sachs, L. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 63, 1418
117. Burger, M.M. (1970) Nature 227, 170
118. Senfton, B.M. und Rubin, H. (1970) Nature 227, 843
119. Gahmberg, C.G. und Hakomori, S. (1975) J. Biol. Chem.
250, 2447
120. Chen, L.B., Gallimore, P.H. und McDougall, J.K. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3570
121. Unkeless, J.C., Tobia, A., Ossowski, L., Quigley, J.P.,
Rifkin, D.B. und Reich, E. (1973) J. Exp. Med. 137, 85
und 112

122. Unkeless, J., Dano, K., Kellerman, G.M. und Reich, E.
(1974) J. Biol. Chem. 249, 4295
123. Yamada, K.M., Ohanian, S.H. und Pastan, I. (1976)
Cell 9, 241
124. Yamada, K.M., Yamada, S.S. und Pastan, I. (1976) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 73, 1217
125. Chen, A.B. und Mosesson, M.W. (1977) Anal. Biochem. 79,
144
126. Timpl, R., Glanville, R.W., Nowack, H., Wiedemann, H.,
Fietzek, P.P. und Kühn, K. (1975) Hoppe-Seyler Z. Physiol.
Chem. 356, 1783
127. Miller, E.J. (1972) Biochemistry 11, 4903
128. Cuatrecasas, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059
129. Stemberger, A. und Hörmann, H. (1975) Hoppe-Seyler Z.
Physiol. Chem. 356, 341
130. Mosesson, M.W. und Finlayson, J.S. (1963) J. Lab. Clin.
Med. 62, 663
131. Hörmann, H. und Gollwitzer, R. (1966) Hoppe-Seyler Z.
Physiol. Chem. 346, 21
132. Furtmayr, H. und Timpl, R. (1971) Anal. Biochem. 41, 510
133. Ouchterlony, Ö. (1958) Progress in Allergy (P. Kallos, Ed.)
5, 1
134. Scheidegger, J.J. (1955) Int. Arch. Allergy 7, 103
135. Beil, W., Timpl, R. und Furtmayr, H. (1973) Immunology
24, 13
136. Gollwitzer, R., Timpl, R., Becker, U. und Furtmayr, H.
(1972) Europ. J. Biochem. 28, 497
137. Laurell, C.B. und Thulin, E. (1975) Scand. J. Immunol.
4, 7
138. Gollwitzer, R., Becker, U. und Timpl, R. (1974) FEBS Lett.
47, 177
139. Timpl, R. und Gollwitzer, R. (1973) FEBS Lett. 29, 92

140. Adelmann, B.C., Gentner, G.J. und Hopper, K. (1973)
J. Immunol. Meth. 3, 319
141. Finlayson, J.S. und Mosesson, M.W. (1963) Biochemistry
2, 42
142. Mosher, D.F. und Blout, E.R. (1973) J. Biol. Chem. 248,
6896
143. Matthias, F.R., Hocke, G. und Lasch, H.G. (1975) Thromb.
Res. 7, 861
144. Blombäck, B., Blombäck, M., Finkbeiner, W., Holmgren, A.,
Kowalska-Loth, B. und Olovson, G. (1974) Thromb. Res. 4,
55
145. Peters, Th. jr., in "The Plasma Proteins: Structure,
Function and Genetic Control", Kapitel III, Bd. I, Aca-
demic Press (1977) Verl. F.W. Putnam
146. Brown, J.R. (1974) Fed. Proc. 33, 1389
147. Goetzl, E.J. und Peters, J.H. (1972) J. Immunol. 108, 785
148. Henschen, A. und Hörmann, H. (1977) Thromb. Res. im Druck
149. Matthias, F.R., Heene, D.L. und Wegrzynowicz, Z. (1974)
Thromb. Res. 4, 803
150. Maurer, P.H. (1954) J. Exp. Med. 100, 497
151. Klebe, R.J. (1974) Nature 250, 248
152. Wolff, I., Timpl, R., Pecker, I. und Steffen, C. (1967)
Vox. Sang. 12, 443
153. Hopper, K.E., Adelmann, B.C., Gentner, G. und Gay, S.
(1976) Immunology 30, 249
154. Laurell, C.B. und Thulin, E. (1974) Immunochemistry 11,
703
155. Fietzek, P.P. und Kühn, K. (1976) "The Primary Structure
of Collagen" Int. Rev. Connective Tissue Res. 7, 1
156. Gay, S., Balleisen, L., Remberger, K., Fietzek, P.P.,
Adelmann, B.C. und Kühn, K. (1975) Klin. Wschrft. 53, 899
157. Balleisen, L., Gay, S., Marx, R. und Kühn, K. (1975)
Klin. Wschrft. 53, 903

158. Wiedemann, H., Chung, E., Fujii, T., Miller, E.J. und Kühn, K. (1975) Eur. J. Biochem. 51, 363
159. Sears, D.W., Kazin, A.R., Mohrer, J., Friedman, F. und Beychok, S. (1977) Biochemistry 16, 2016
160. Sears, D.W. und Beychok, S. (1977) Biochemistry 16, 2026
161. Sears, D.W., Mohrer, J. und Beychok, S. (1977) Biochemistry 16, 2031
162. Henning, R., Milner, R.J., Reske, K., Cunningham, B.A. und Edelmann, G.M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci USA 73, 118
163. Pollard, T.D. und Weihing, R.R. (1974) CRC Crit. Rev. Biochem. 2, 1
164. Fésüs, L. und Laki, K. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 131
165. Engvall, E. und Ruoslahti, E. (1977) Int. J. Cancer 20, 1
166. Colvin, R.B. und Dvorak, H.F. (1975) J. Exp. Med. 142, 1377
167. Sherman, L.A. und Lee, J. (1977) J. Exp. Med. 145, 76
168. Kleinman, H.K., McGoodwin, E.B. und Klebe, R.J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 426
169. Dessau, W., Adelmann, B.C., Timpl, R. und Martin, G.R. (1978) Biochem. J. 169, 55
170. Niewiarowski, St., Regoezi, E. und Mustard, J.F. (1972) Proc. Soc. Exp. Biol. 140, 199
171. Beck, E., Duckert, F., Vogel, A. und Ernst, M. (1962) Zschrft. Zellforsch. 57, 327
172. Chen, L.B. und Buchanan, J.M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 131
173. Teng, N.N.H. und Chen, L.B. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 413
174. Dolfini, E., Azzarone, B., Pedulla, D., Ottaviano, E., de Gaetano, G., Donati, M.B. und Morasca, L. (1976) Europ. J. Cancer 12, 823

175. Liotta, L.A., Kleinerman, J., Catanzara, P. und Rynbrandt, D. (1977) J. Natl. Cancer Inst. 58, 1427
176. Mosher, D.M. und Vaheri, A. (1977) J. Biol. Chem. im Druck
177. Pohjanpelto, P. (1977) J. Cell. Physiol. 91, 387
178. Zetter, B.R., Chen, L.B. und Buchanan, J.M. (1977) Cell 7, 407

Veröffentlichungen, die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen sind:

- I Stemberger, A. und Jilek, F. (1976)
Rat Fibrinogen reveals Similarities to Human Fibrinogen of relatively high Solubility
Thromb. Res. 9, 657
- II Jilek, F. und Hörmann, H. (1977)
Cold-insoluble Globulin, II. Plasminolyse of Cold-insoluble Globulin
Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 358, 133
- III Jilek, F. und Hörmann, H. (1977)
Cold-insoluble Globulin, III. Cyanogen Bromide and Plasminolysis Fragments containing a Label introduced by Transamidation
Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 358, 1165
- IV Hörmann, H. und Jilek, F. (1977)
Funktionelle Reaktionen eines Oberflächenproteins von Fibroblasten
Vortrag, gehalten auf der 2. Jahrestagung des Arbeitskreises für Rheumatologie, Balneologie und soziales Design, Wien-Oberlaa, 1. und 2. April 1977
Wiener klinische Wochenschrift 21, 728

- V Stemberger, A., Jilek, F., Hörmann, H. und Blümel, G.
(1977)
Fibrinogen-Collagen-Interactions
Thromb. Haem. 38, 191
- VI Dessau, W., Jilek, F., Adelmann, B.C. und Hörmann, H.
(1977)
Similarities of Antigelatine Factor and Cold-insoluble
Globulin
Biochim. Biophys. Acta im Druck
- VII Dessau, W., Adelmann, B. und Jilek, F. (1977)
Charakterisierung eines Serumproteins mit selektiver
Affinität zu denaturiertem Kollagen
Vortrag, gehalten auf der 2. Jahrestagung des Arbeits-
kreises für Rheumatologie, Balneologie und soziales
Design, Wien-Oberlaa, 1. und 2. April 1977
Wiener klinische Wochenschrift im Druck
- VIII Hörmann, H., Stemberger, A. und Jilek, F. (1976)
Interaction of a soluble Fibroblast Surface Protein with
Fibrin
Vortrag, gehalten auf dem First Munich Symposium on
Biology of the Connective Tissue, München, Juli 1976
Thromb. Diath. Haemorrh. im Druck
- IX Jilek, F. und Hörmann, H. (1978)
Cold-insoluble Globulin (Fibronectin), IV. Affinity to
soluble Collagen of various Types
Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. im Druck
- X Hörmann, H. und Jilek, F. (1977)
Cold-insoluble Globulin: Transamidation sensitive Site
and Affinity Behaviour
Abstracts Conference on Fibroblast Surface Protein,
New York, Dezember 1977
Ann. N.Y. Acad. Sci. im Druck
- XI Hörmann, H. und Jilek, F. (1977)
Cold-insoluble Globulin: Plasminolysis, Crosslinking
Sites and Affinity Behaviour
Abstracts 11th FEBS Meeting, Copenhagen, August 1977

XII Dessau, W. und Jilek, F. (1977)

Interaction of the Serum-derived AGF and denatured
Collagen

Abstracts Symposium on Biology of Connective Tissue,
Uppsala, September 1977

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, unter der Anleitung von Prof. Dr. Helmut Hörmann durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Helmut Hörmann danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, für wertvolle Anregungen, Ratschläge und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Kühn gilt mein Dank für das entgegengebrachte Interesse und die wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Frau L. Loibl, Frau M. Hable und Frau V. Jelinic gebührt mein Dank für ausgezeichnete technische Assistenz.

Danken möchte ich auch allen Kollegen innerhalb unserer Abteilung, die mir mit experimenteller Erfahrung und objektiver Kritik geholfen haben.

Nicht zuletzt danke ich Frl. Lydia Steiner für die Anfertigung dieser ansprechenden Reinschrift.

LEBENS LAUF

Am 5.3.1948 wurde ich als Sohn des kaufm. Angestellten Franz Jilek und seiner Ehefrau Emmi, geb. Soldan, in München geboren.

Von September 1954 bis Juli 1959 besuchte ich die Volksschule an der Senftenauerstraße in München und trat im September 1959 in die Ludwigs-Oberrealschule, das spätere Erasmus-Grasser-Gymnasium, in München ein. Dort legte ich im Juli 1968 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1968/69 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Chemie auf und legte im Februar 1971 die Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie ab. Im Oktober 1973 absolvierte ich die Diplomhauptprüfung für Chemiker und begann im Dezember 1973 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Prof. Dr. H. Hörmann mit der Diplomarbeit. Nach Eingabe eines Zwischenberichtes erhielt ich die Erlaubnis zur Promotion und begann im Februar 1975 in derselben Arbeitsgruppe mit der Dissertation. Seit Oktober 1977 bin ich Verwalter einer wiss. Assistentenstelle.

Seit Juni 1975 bin ich mit meiner Frau Gabriele, geb. Drath, verheiratet. Im November 1977 kam unser Töchterchen Michaela Andrea zur Welt.

